



Evaluación en yuca (*Manihot esculenta* Crantz) de genes involucrados en la ruta metabólica del etileno frente al estrés ocasionado por *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae)

JUAN CAMILO SÁNCHEZ MORALES

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
VILLAVICENCIO, COLOMBIA
2018**

Evaluación en yuca (*Manihot esculenta* Crantz) de genes involucrados en la ruta metabólica del etileno frente al estrés ocasionado por *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae)

JUAN CAMILO SÁNCHEZ MORALES

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo

Director:

Jaime Alberto Marín Colorado, M. Sc., Ph.D.

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y QUÍMICA
PROGRAMA DE BIOLOGIA
VILLAVICENCIO, COLOMBIA
2018**

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por el apoyo incondicional durante toda mi carrera.

A mi director, el Dr. Jaime Marín Colorado, por sus consejos y colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Deicy Villalba por su colaboración en el análisis estadístico.

A mis compañeros de laboratorio Laura Paola López, Alejandro Valencia y Wilmer Alexis Vargas por su compañía y amistad durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A Javier Augusto Rey por su colaboración en la fase final de este trabajo.

Al laboratorio de Biología Molecular y al grupo de estudio BIBA por su colaboración durante el desarrollo de este proyecto.

A la Universidad de los Llanos y a la Dirección General de Investigaciones por permitirse financiar este proyecto de investigación.

Y a todas las personas que de alguna forma contribuyeron en la realización de este trabajo.

RESUMEN

La yuca (*Manihot esculenta*) es uno de los principales cultivos de la región tropical debido a su alto contenido de carbohidratos en forma de almidón. No obstante, se ve afectada por el ataque de artrópodos plaga como el ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*), el cual provoca grandes pérdidas en el rendimiento y en la producción de la yuca. Una forma de defensa natural en las plantas se ve reflejada en la expresión de genes, los cuales activan una serie de cascadas de señalización para hacer frente al estrés ocasionado por la interacción del ácaro con la planta. El etileno es una fitohormona gaseosa que regula el crecimiento y desarrollo de las plantas, está involucrada en la muerte celular como respuesta a factores de estrés biótico y abiótico, y también modula la muerte celular inducida por patógenos de plantas, exposición al ozono, y órgano-senescencia. Se evaluó la oviposición del ácaro verde sobre dos genotipos de yuca (CMC-40 y ECU-72) y la expresión de tres genes relacionados con el etileno (1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa, DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP y Protoclorofilida reductasa A) en los genotipos vegetales ECU-72 y CMC-40. Se caracterizó las regiones promotoras de los genes 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa, DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP y Protoclorofilida reductasa A. Con la evaluación de los genotipos de yuca en este estudio se confirmó como genotipo susceptible CMC-40 y como genotipo resistente ECU-72.

Palabras clave: ácaro verde, etileno, expresión de genes, genotipos.

ABSTRACT

The cassava (*Manihot esculenta*) is one of the main crops of the tropical region due to its high content of carbohydrates in the form of starch. However, it is affected by the attack of plague arthropods such as the green mite (*Mononychellus tanajoa*), which causes large losses in the yield and production of cassava. A form of natural defense in plants is reflected in the expression of genes, which activate a series of signaling cascades to cope with the stress caused by the interaction of the mite with the plant. Ethylene is a gaseous phytohormone that regulates the growth and development of plants, is involved in cell death in response to biotic and abiotic stress factors, and also modulates cell death induced by plant pathogens, ozone exposure, and organ-senescence. The oviposition of the green mite was evaluated on two cassava genotypes (CMC-40 and ECU-72) and the expression of three genes related to ethylene (1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 20 and Protochlorophyllide oxidoreductase A) was evaluated in the plant genotypes ECU-72 and CMC-40. The promoter regions of the genes 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 20 and Protochlorophyllide oxidoreductase A were characterized. With the evaluation of cassava genotypes in this study was confirmed as susceptible genotype CMC- 40 and as a resistant genotype ECU-72.

Key words: *cassava, ethylene, gene expression, genotypes, green mite.*

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 13 |
| 2. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA | 15 |
| 3. HIPÓTESIS | 16 |
| 4. OBJETIVOS..... | 17 |
| 4.1 Objetivo general..... | 17 |
| 4.2 Objetivos específicos | 17 |
| 5. JUSTIFICACIÓN | 18 |
| 6. MARCO TEÓRICO | 21 |
| 6.1 El cultivo de la yuca..... | 21 |
| 6.2 Plagas del cultivo de la yuca..... | 22 |
| 6.3 El ácaro verde (<i>Mononychellus tanajoa</i>)..... | 22 |
| 6.4 Oviposición | 24 |
| 6.5 Etileno | 25 |
| 6.6 Regiones promotoras | 26 |
| 7. METODOLOGÍA Y ÁREA DE ESTUDIO | 28 |
| 7.1 Evaluación fenotípica | 28 |
| 7.1.1 Material biológico..... | 28 |
| 7.1.2 Colecta del ácaro verde..... | 28 |
| 7.1.3 Libre escogencia..... | 29 |
| 7.1.4 No libre escogencia..... | 29 |
| 7.1.5 Análisis estadístico..... | 30 |
| 7.2 Análisis molecular de la interacción planta-ácaro..... | 31 |
| 7.2.1 Análisis <i>in silico</i> | 31 |
| 7.2.1.1 Búsqueda de genes con el software Genevestigator | 31 |
| 7.2.1.2 Diseño de primers | 32 |
| 7.2.1.3 Caracterización estructural de las regiones promotoras..... | 32 |
| 7.2.1.3.1 Búsqueda y alineamiento de secuencias..... | 33 |
| 7.2.1.3.2 Búsqueda de promotores | 33 |
| 7.2.2 Análisis de expresión de genes..... | 33 |
| 7.2.2.1 Extracción de ARN..... | 34 |
| 7.2.2.2 Cuantificación y gel de calidad..... | 34 |

| | |
|---|----|
| 7.2.2.3 Síntesis de ADNc | 34 |
| 7.2.2.4 PCR | 35 |
| 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 36 |
| 8.1 Preferencia de oviposición | 36 |
| 8.1.1 Libre escogencia..... | 36 |
| 8.1.2 No libre escogencia..... | 38 |
| 8.2 Análisis molecular de la interacción planta-ácaro..... | 40 |
| 8.2.1 Análisis <i>in silico</i> | 40 |
| 8.2.1.1 Genes relacionados con la vía del etileno reportados en la base de datos de Genevestigator..... | 40 |
| 8.2.1.2 Caracterización estructural de las regiones promotoras..... | 43 |
| 8.2.2 Análisis de la expresión génica | 54 |
| 9. CONCLUSIONES | 61 |
| 10. BIBLIOGRAFÍA | 63 |

CAPÍTULO 1: INFORME FINAL

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diseño del experimento a libre escogencia. a), caja de Petri con cinco lóbulos de CMC-40 y cinco lóbulos de ECU-72 intercalados para un total de diez lóbulos. b), seis cajas de Petri con un total de 30 repeticiones de lóbulos por genotipo. 29

Figura 2. Diseño del experimento a no libre escogencia. Seis cajas de Petri con diez lóbulos, de las cuales tres cajas contienen lóbulos ECU-72 y tres cajas contienen lóbulos CMC-40 para un total de 30 repeticiones de lóbulos por cada genotipo. 30

Figura 3. Modelo de cajas y bigotes. Número de huevos según genotipo y día, a libre escogencia. 36

Figura 4. Curva de oviposición de los genotipos CMC-40 y ECU-72, a libre escogencia. 38

Figura 5. Modelo de cajas y bigotes. Número de huevos según genotipo y día, a no libre escogencia. 39

Figura 6. Curva de oviposición de los genotipos CMC-40 y ECU-72, a no libre escogencia. 40

Figura 7. Gen PORA con niveles reprimidos de expresión génica en la interacción de *Arabidopsis thaliana* con *Bemisia tabaci*. 42

Figura 8. Gen ERF6 con niveles reprimidos de expresión génica en la interacción de *Arabidopsis thaliana* con *Bemisia tabaci*. 42

Figura 9. Secuencias del gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa encontradas en yuca. 43

Figura 10. Árbol Neighbor-Joining de las secuencias de *Arabidopsis thaliana* y *Manihot esculenta* del gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa. 44

Figura 11. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen 1-

aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa en *Arabidopsis thaliana*. 45

Figura 12. Motivos *cis* putativos encontrados en el promotor de gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa en *Arabidopsis thaliana*. 46

Figura 13. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa en el cromosoma 16 de *Manihot esculenta*. 47

Figura 14. Árbol Neighbor-Joining de las secuencias de *Arabidopsis thaliana* y *Manihot esculenta* del gen DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP. 48

Figura 15. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP en *Arabidopsis thaliana*. 49

Figura 16. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP en el cromosoma 11 de *Manihot esculenta*. 50

Figura 17. Árbol Neighbor-Joining de las secuencias de *Arabidopsis thaliana* y *Manihot esculenta* del gen Protoclorofilida reductasa A. 51

Figura 18. Secuencias del gen Protoclorofilida reductasa A encontradas en *Manihot esculenta*. 52

Figura 19. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen Protoclorofilida reductasa A en *Arabidopsis thaliana*. 52

Figura 20. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen Protoclorofilida reductasa A en el cromosoma 3 de *Manihot esculenta*. 53

Figura 21. Muestras de ADNc amplificadas con el primer G3PDH, que amplifica un fragmento del gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. 55

Figura 22. Muestras de ADNc amplificadas con el primer ACO4, que amplifica un fragmento del gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa. 56

Figura 23. Proteína 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa bajo sobre-regulación identificada por Marín-Colorado (2015) mediante progénesis implicados en metabolismo de hormonas para el genotipo 60444. Los valores en los tiempos evaluados explican la regulación de las proteínas. 56

Figura 24. Muestras de ADNc amplificadas con el primer DBRH20, que amplifica un fragmento del gen DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP. 57

Figura 25. Proteína DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP bajo sobre-regulación identificada por Marín-Colorado (2015) mediante progénesis implicados en metabolismo de hormonas para el genotipo 60444. Los valores en los tiempos evaluados explican la regulación de las proteínas. 58

Figura 26. Muestras de ADNc amplificadas con el primer PORA, que amplifica un fragmento del gen Protoclorofilida reductasa A. 59

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Primers diseñados que amplifican un fragmento de los genes 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa, DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP y Protochlorophyllide reductasa A en yuca. 32

Tabla 2. Reacciones del cóctel preparado para la amplificación de los genes por PCR. 35

Tabla 3. Muestras de ARN utilizadas en el análisis molecular de la interacción planta-ácaro verde. 54

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas se han visto obligadas a desarrollar diferentes estrategias debido a su estilo de vida inmóvil para contrarrestar los distintos tipos de estrés (biótico y abiótico), así como a las lesiones causadas por heridas (Heyman *et al.*, 2018). Cuando esto ocurre, las plantas responden a las heridas mediante la activación de sus sistemas de defensa (Savatin *et al.*, 2014), lo que conlleva a la iniciación de una cascada de señalización. Esto sucede mediante la inducción de proteínas relacionadas con la defensa y la activación de hormonas como el etileno y el ácido jasmónico que están relacionadas con heridas, así como de genes para respuestas generales de estrés (estrés oxidativo, estrés por deshidratación, proteínas de choque térmico, etc.) (Delessert *et al.* 2004; Savatin *et al.*, 2014).

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un arbusto perenne leñoso de la familia Euphorbiaceae originario de Sudamérica (Olsen & Schaal, 2001; Aguilera, 2012), la yuca es un cultivo con una gran plasticidad, lo que le permite adaptarse a diferentes tipos de suelos y condiciones climáticas tropicales, crece en los trópicos húmedos y cálidos de tierras bajas, de mediana altitud, y en los subtrópicos con inviernos fríos y lluvias en verano, además, es resistente a las fuertes sequías (Aguilera, 2012; Pastrana *et al.*, 2015). El valor económico de la yuca es amplio, a partir de sus raíces como fuente de carbohidratos, los cultivos se pueden dirigir a cuatro mercados fundamentalmente: el consumo humano, la industria alimenticia, la industria de alimentos para animales y la industria no alimenticia (Suárez & Mederos, 2011). La producción mundial de yuca en el año 2006 fue alrededor de 203 millones de toneladas, de las cuales Colombia aportó 2,1 millones de toneladas (FAO, 2006). En el 2008 alcanzó una producción mundial de casi 280 millones de toneladas (FAO, 2012). En Latinoamérica, la producción ha dado un impulso a la industria de la yuca, especialmente en Brasil, Paraguay y Colombia, donde los productores colombianos destinan las raíces de yuca al consumo humano, al uso industrial y en menor medida para la alimentación animal (Pastrana *et al.*, 2015). A pesar de que la yuca tiene una gran producción, esta se ve afectada por alrededor de 200 especies de

artrópodos plaga asociadas al cultivo, entre las que se destaca el ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*) (Bellotti *et al.*, 2012).

El ácaro verde (*M. tanajoa*) pertenece a la familia Tetranychidae, es originario de Sudamérica y es conocido por ser una importante plaga para los cultivos de yuca (Yonow & Kriticos, 2014), se considera que ha coevolucionado con el cultivo, al punto de adaptarse a las barreras físicas y químicas como lo son los compuestos laticíferos y cianogénicos, claves en la defensa bioquímica natural de la planta (Bellotti & Riis, 1994; Marín-Colorado, 2015). El grado de daño ocasionado por este artrópodo en cultivos de yuca, varía de acuerdo a las condiciones ambientales, la fertilidad del suelo, la edad de la planta y la prolongación del ataque (Bellotti, 2000; Marín-Colorado, 2015).

Los agricultores a menudo utilizan plaguicidas para evitar la infestación de artrópodos plagas en los cultivos (CIAT, 2006), la aplicación continua de agentes tóxicos conlleva a que el ácaro genere tolerancia al producto químico, por lo que al final la plaga resulta siendo más resistente (Faria & Wraight, 2001). Además de que incrementa significativamente los niveles de contaminación ambiental (Panda & Khush, 1995), también genera graves impactos en la salud pública (Arias & Guerrero, 2000). Por tal motivo siempre es recomendado tener un riguroso control biológico que permita un manejo integrado de plagas apropiado para mejorar la resistencia del hospedero y así mejorar la producción de yuca (Marín-Colorado, 2015).

2. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un alimento esencial en los países tropicales y una fuente de carbohidratos para cerca de 800 millones de personas (Gleadow *et al.*, 2009; FAO, 2014). Sin embargo, los cultivos de yuca se ven afectados por una gran variedad de artrópodos plaga que causan pérdidas en el rendimiento y producción de la planta, dentro de los cuales el ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*) se encuentran dentro de las especies que más afectan al cultivo (Bellotti, 2008).

El ácaro verde se alimenta del envés de las hojas jóvenes emergentes, ocasiona daños directos en la planta debido a su alimentación del floema, lo que desarrolla malformaciones y reducción del tamaño con una marcada clorosis o amarillamiento foliar, esto provoca un aumento en la resistencia estomática, por lo que se presenta un deterioro en el intercambio gaseoso, en la reducción de la transpiración y en las tasas fotosintéticas (Álvarez *et al.*, 2002; Burbano *et al.*, 2007). En casos de infestaciones severas, ocurre la defoliación, comenzando en la parte superior de la planta, matando yemas, brotes apicales y laterales (Bellotti, 2008). Todas estas afecciones en la capacidad fotosintética, conllevan a la pérdida de hasta un 53 % del rendimiento del cultivo (Bellotti *et al.*, 2006).

El estrés ocasionado por el ácaro verde obliga a la planta a iniciar cascadas de señalización, por ejemplo, se sabe que las plantas al sentir un contacto físico con los artrópodos recurren a la activación en la membrana plasmática de los canales de iones de Ca^{++} (Nakagawa *et al.*, 2007; Haswell *et al.*, 2008), una alta concentración de Ca^{++} en el citosol puede resultar en el disparo de señales de transducción, la cual conduce a la inducción de genes involucrados en la defensa de la planta (Ouaked *et al.*, 2003; Braam, 2005). Por tal motivo, es indispensable comprender la regulación génica que constituye la base para establecer estrategias de fitomejoramiento, lo que permitirá seleccionar plantas con una mejor capacidad de resistencia al ataque del ácaro verde.

3. HIPÓTESIS

H₁: Los dos genes involucrados en la vía metabólica del etileno se expresan en la yuca bajo el ataque del ácaro verde.

H₂: Al menos uno de los dos genes involucrados en la vía metabólica del etileno se expresa en la yuca bajo el ataque del ácaro verde.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la expresión de genes involucrados en la ruta metabólica del etileno durante el ataque ocasionado por *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae) en dos genotipos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz).

4.2 Objetivos específicos

Evaluar el efecto de la oviposición de *Mononychellus tanajoa* en dos genotipos de yuca (CMC-40 y ECU-72).

Analizar la expresión de los dos genes: 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa y DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP, durante el ataque de *Mononychellus tanajoa*.

5. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de la yuca se debe principalmente a su raíz tuberosa que almacena un alto contenido de energía, se utiliza tanto para la alimentación humana como para la de algunos animales, sus raíces son ricas en carbohidratos, además, las hojas son fuente de proteínas, vitaminas y minerales (Aguilera, 2012; Pastrana *et al.*, 2015; Suárez & Mederos, 2011). Es un cultivo de importancia para países tropicales en vía de desarrollo, esta planta crece en una amplia gama de condiciones tropicales como los trópicos húmedos, los trópicos cálidos de tierras bajas y los trópicos de altitud media. Por esta razón, se destaca como el cuarto producto básico más importante después del arroz, el trigo y el maíz (Aristizábal & Sánchez, 2007), y como el sexto cultivo en términos de producción (Nhassico *et al.*, 2008). Colombia se ubica como el tercer mayor productor de yuca en Latinoamérica con 2,1 millones de toneladas al año, superado solo por Paraguay y Brasil (FAO, 2006). Sus hojas y raíces son adecuadas para el consumo humano ya que estas son una fuente de carbohidratos, además, sus raíces son fuente de proteínas y vitaminas, en especial de carotenos y de vitamina C (CIAT, 2002). Sin mencionar que además de ser importante como fuente de alimento, tiene un valor trascendental en la industria para la obtención de almidón (Ceballos *et al.*, 2006) y de etanol (Jansson *et al.*, 2009). La yuca se caracteriza por su tolerancia a las sequías y a los suelos degradados, con gran capacidad de adaptarse a diferentes condiciones de crecimiento. Sin embargo, existe una gran variedad de artrópodos plaga que afectan los cultivos de yuca (*Mononychellus tanajoa*, *Aleurotrachelus socialis*, *Tetranychus urticae*, *Bemisia tabaci*, entre otros), que además de generar pérdidas en la producción del cultivo (Bellotti, 2008; Bellotti *et al.*, 2012), también puede generar consecuencias ecológicas a causa del indebido uso de plaguicidas, esto puede conllevar a que dichas plagas herbívoras desarrollen resistencias a determinados insecticidas (Devine *et al.*, 2008). De hecho, se cree que las plagas herbívoras, las cuales con frecuencia interactúan con los alcaloides vegetales, están “pre-adaptadas” de alguna manera para hacer frente a las sustancias químicas que amenazan a su medio ambiente (Bisset, 2002). Una herramienta útil es el Manejo Integrado de

Plagas (MIP), el cual sugiere mediante la aplicación de técnicas biológicas, biotecnológicas y de selección vegetal, mantener al mínimo necesario la población de la plaga, y así poder reducir y evitar daños en la producción del cultivo (Pérez, 2006; Márquez, 2011).

Anualmente el ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*) causa una pérdida de la masa corporal de la hoja de la yuca hasta de un 50%, y una reducción en el rendimiento de la raíz en un 80% (Pallangyo *et al.*, 2007). Investigaciones en campo demuestran que los ataques con periodos de duración dentro de los 3 y 6 meses del ácaro verde, pueden causar hasta un 79% de pérdida en la producción de raíz (Bellotti *et al.*, 1999). Cuando esto sucede, generalmente ocurren daños severos con pérdidas en el rendimiento fotosintético de hasta en un 90%, pérdida de la longevidad foliar de hasta un 78% y reducción en el tamaño de la hoja hasta en un 65% (Marín-Colorado, 2015).

Las plantas realizan cambios drásticos en su transcriptoma para responder adecuadamente al cambio ambiental, de igual forma la regulación de los genes que son específicos a los estreses bióticos y abióticos son clave para la supervivencia de las plantas. Estas defensas pueden influir en la sedimentación, oviposición, fertilidad, crecimiento y desarrollo de los herbívoros, ya sea solos o en conjunto (Harfouche *et al.*, 2006). Los mecanismos que controlan la expresión génica están determinados principalmente por la transcripción de ARN mensajero (ARNm) a partir de ADN genómico. El conocimiento detallado de las regiones promotoras de los genes, esenciales para la transcripción, y de los diferentes factores de transcripción implicados en la activación del promotor constituye, un prerequisite para conocer los mecanismos de regulación génica. La transcripción de ADN en ARNm mediante la ARN polimerasa II da lugar a la generación de un ARNm primario que posteriormente da lugar a un ARNm maduro mediante un proceso de corte y empalme de exones e intrones. El ARN maduro es traducido a proteína por los ribosomas, y en determinados casos dicha proteína ha de ser modificada con posterioridad para que sea funcional (regulación postranscripcional) (Franco *et al.*,

2002). La transcripción del gen de defensa a menudo va acompañada de ajustes significativos en los niveles de expresión de genes metabólicos y estructurales para reasignar recursos, reparar daños y/o inducir la senescencia (Rehrig *et al.*, 2011). Por ejemplo, la respuesta y la recuperación del ataque de insectos requiere la coordinación de múltiples vías génicas, incluidas las relacionadas con la química de defensa secundaria, el estado hídrico, la fotosíntesis, la señalización celular y el recrecimiento (Tang *et al.*, 2008; Rehrig *et al.*, 2011). Las plantas producen etileno en respuesta a varios factores de estrés bióticos y abióticos, en la exposición al ozono, las plantas inducen genes implicados en la biosíntesis de etileno (Overmyer *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2002). Aunque algunos estudios respaldan una relación casual entre los niveles de etileno y la sensibilidad de la planta al ozono (Wellburn & Wellburn, 1996), aún no está claro si el etileno actúa solo o junto con otras vías de señalización.

La evaluación de la expresión de genes involucrados en la vía metabólica del etileno contribuye en el conocimiento sobre los factores que se ven implicados en la regulación génica, particularmente en los motivos *cis* que regulan dicha expresión. El gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxiadasa se relaciona con respuestas al estrés biótico y abiótico, señales de desarrollo y con mecanismos de regulación postranscripcionales y postraduccionales (Dorling & McManus, 2012; Datta *et al.*, 2015). Por otra parte, el gen DEAD-box ARN helicasa participa en varios procesos biológicos, desempeña un rol importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas, se caracteriza por una mayor tolerancia al estrés oxidativo y por su expresión en defensa oxidativa (Aubourg *et al.*, 1999, Boudet *et al.*, 2001). De modo que, el estudio de estos genes supone un cimiento para futuras estrategias que contrarresten los estragos ocasionados por *Mononychellus tanajoa*, considerado como una de las plagas que más afectan a los cultivos de la yuca en el mundo (Bellotti, 2008), siendo este, un ejemplo del uso de tecnologías de la genómica funcional que contribuyen en el conocimiento de los procesos relacionados con la defensa de las plantas y con las respuestas a condiciones ambientales y de estrés en general.

6. MARCO TEÓRICO

6.1 El cultivo de la yuca

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un arbusto perenne leñoso perteneciente a la familia Euphorbiaceae y originario de Sudamérica (Olsen & Schaal, 2001; Aguilera, 2012), el género *Manihot* comprende 98 especies distribuidas en el Neotrópico (Rogers & Appan, 1973; Marín-Colorado, 2015), es un cultivo con una gran plasticidad, lo que le permite adaptarse a diferentes tipos de suelos y condiciones climáticas tropicales, la yuca crece en los trópicos húmedos y cálidos de tierras bajas, de mediana altitud, y en los subtrópicos con inviernos fríos y lluvias en verano, además, es resistente a las fuertes sequías (Aguilera, 2012; Pastrana *et al.*, 2015). Desde su introducción a África y Asia, la yuca ha contribuido a la seguridad alimentaria y a el mejoramiento del nivel de vida de más de mil millones de personas alrededor del mundo (Balagopalan, 2002; Bohórquez, 2011).

El valor económico de la yuca es amplio, debido a los altos rendimientos de almidón, la yuca no solo es considerado un cultivo de subsistencia, también es un cultivo industrial particularmente en el sureste de Asia y en Latinoamérica (Mann, 1997). A partir de sus raíces como fuente de carbohidratos, los cultivos se dirigen a cuatro mercados fundamentalmente: el consumo humano, la industria alimenticia, la industria de alimentos para animales y la industria no alimenticia (Suárez & Mederos, 2011). En Latinoamérica, la producción ha dado un impulso a la industria de la yuca, especialmente en Brasil, Paraguay y Colombia. Los productores colombianos destinan principalmente las raíces de yuca al consumo humano, al uso industrial y en menor medida para la alimentación animal (Pastrana *et al.*, 2015).

Actualmente, los rendimientos de yuca se ven afectados por suelos pobres en nutrientes, estaciones secas prolongadas, y daños ocasionados por patógenos e insectos (Bohórquez, 2011; Marín-Colorado, 2015). Además, factores del medio ambiente como la temperatura, el sol, la lluvia, la humedad relativa, la velocidad de descomposición y los cambios en la composición atmosférica, afectan la productividad de los cultivos (Eke-Okoro *et al.*, 2009). Todos estos factores hacen

que el daño causado por insectos floemófagos se incrementaría (Bohórquez, 2011).

6.2 Plagas del cultivo de la yuca

Existe una gran variedad de artrópodos plaga que atacan el cultivo de la yuca, la mayoría se encuentran reportados en Sudamérica debido a que su origen se da en este continente (Bellotti *et al.*, 2006). Entre los que más causan pérdidas en el rendimiento están los ácaros (*Mononychellus* spp), las moscas blancas (*Aleurotrachellus* sociales, *Aleurothrixus* aepim, *Bemisia* tuberculata), los trips (*Frankliniella* williamsi), el gusano cachón (*Erinnyis* ello), el piojo harinoso (*Phenacoccus* manihoti y *Phenacoccus* herreni), el chinche de encaje (*Vatiga* illudens, *Vatiga* manihotae y *Amblystira* machalana), el chinche subterráneo o la viruela de la yuca (*Cyrtomenus* bergi). y los barrenadores de tallo (*Chilomima* clarkei, *Coleosternus* spp) (Bellotti *et al.*, 2006; Bohórquez, 2011).

En África y Asia, las moscas blancas (*Bemisia* afer y *Bemisia* tabaci) son la mayor amenaza para la producción de la yuca, debido a que estas son vectores de geminivirus (Hillocks, 2002). El virus que causa la enfermedad del mosaico en yuca se encuentra restringido al África y a algunas partes de Asia (Ceballos *et al.* 2004; Maruthi *et al.*, 2005), posiblemente, porque las moscas blancas se benefician del mutualismo entre virus y el biotipo 'B' de *Bemisia* tabaci (Inbar & Gerling, 2008). Sin embargo, no se han reportado casos de *Bemisia* tabaci que colonicen a la yuca en Latinoamérica (Hillocks, 2002; Bohórquez, 2011).

6.3 El ácaro verde (*Mononychellus* tanajoa)

El ácaro verde es una de las plagas más importantes para el cultivo de la yuca en Sudamérica (Brasil, Colombia, Venezuela y Perú), en África (Uganda, Ghana y Nigeria) y en Asia y Oceanía (Indonesia, Filipinas y Nueva Guinea) (Herrera, 2009; Marín-Colorado, 2015). Pertenece a la familia Tetranychidae, junto con aproximadamente 1200 especies, el género *Mononychellus* está representado por

28 ácaros herbívoros, de los cuales algunos de ellos son plagas notorias de la yuca (Mutisya *et al.*, 2016; Vásquez-Ordóñez & Parsa, 2014). *Mononychellus tanajoa* se reportó inicialmente en el Noreste de Brasil en 1938, posteriormente apareció por primera vez en África (Uganda) en 1971 y se terminó dispersando por todo el cinturón yuquero en alrededor de 27 países (Yaninek, 1988).

El ácaro verde es oligófago, lo que significa que tiene una dieta muy específica, solo se alimenta de *Manihot esculenta* y de especies relacionadas al género *Manihot*, se puede reproducir sobre *Manihot pseudoglaziovii* y *Passiflora cincinnata* (Mendonca *et al.*, 2011), además, se puede desarrollar sobre la planta del frijol (*Phaseolus vulgaris*), pero no se reproducen sobre ésta (Yonow & Kriticos, 2014). Esta plaga ocasiona daño al insertar sus quelíceros en la superficie de la hoja y al succionar el fluido de las células del parénquima empalizada y del mesófilo esponjoso (Burbano, 2003; Marín-Colorado, 2015), el daño ocasionado reduce en gran medida las tasas de fotosíntesis de la planta, como consecuencia se disminuye el crecimiento de la raíz; asimismo, las altas densidades del ácaro verde, pueden dar lugar a la defoliación y aumentar la susceptibilidad al estrés (Yonow & Kriticos, 2014). El ataque del ácaro verde es favorecido por condiciones de clima seco, uso de variedades susceptibles, fertilización inadecuada y por la presencia de malas hierbas, lo que genera una reducción en la producción de hasta un 80% (Bellotti *et al.*, 1999; Marín-Colorado, 2015).

Los ácaros verdes que se alimentan en variedades de yuca susceptibles tienen una alta fecundidad, un tiempo corto de desarrollo, un largo periodo de vida de adultos con baja mortalidad de larvas y ninfas; en comparación con los ácaros que se alimentan en variedades de yuca resistentes (Byrne *et al.*, 1983). La reproducción del ácaro varía según las condiciones climáticas, en temporadas secas son de rápido desarrollo y reproducción, incrementando su densidad poblacional en este tipo de clima, por el contrario, en temporadas de lluvias, su densidad decae a causa de los efectos físicos de la lluvia y del viento que tiene sobre el ácaro (Costa *et al.*,

2012).

6.4 Oviposición

Estudios realizados sobre interacciones planta-insecto han demostrado que la alimentación por insectos o la aplicación de secreciones orales a las heridas inducen la liberación de compuestos volátiles como los terpenos, los volátiles de hojas verdes, el etileno, entre otros, para evitar el daño mecánico (Arimura *et al.*, 2004; De Moraes *et al.*, 2001; Schmelz *et al.*, 2006). De tal modo que las plantas pueden responder a los fluidos de oviposición de insectos, anticipándose a un inminente herbivoría o para atraer predadores que se coman los huevos (Hilker & Meiners, 2006).

El estudio de la oviposición de artrópodos plagas, sobre plantas hospederas bajo condiciones controladas de laboratorio, resulta ser una herramienta de fácil acceso para el entendimiento de ciertos factores que influyen en las pérdidas del rendimiento de los cultivos. Trabajos de este tipo han servido para proporcionar información sobre los períodos de preoviposición, oviposición, incubación, así como, índices de eficiencia en la producción de huevos e índices de conversión (Brentassi & de Remes, 2015; López *et al.*, 2015). La influencia de factores ambientales, tales como temperatura y humedad relativa sobre la biología oviposicional, se relaciona principalmente con los sitios de oviposición, puesto que es un comportamiento mediado por múltiples factores abióticos y bióticos (Martínez *et al.*, 2013a; 2013b). Igualmente, la oviposición de distintas especies ha demostrado tendencias a desarrollar comportamientos específicos, los cuales favorecen en gran medida el éxito reproductivo de las especies plaga. Conductas como el empleo de estrategias anti depredadores, protección de los huevos contra factores ambientales y establecer los huevos cerca a fuentes de alimento para las crías, constituyen ejemplos de dichas adaptaciones (Carrillo *et al.*, 2002).

6.5 Etileno

El etileno es una fitohormona gaseosa que regula el crecimiento y el desarrollo de las plantas, está implicada en respuesta de defensa a patógenos y herbívoros, en procesos de muerte celular como respuesta a factores de estrés biótico y abiótico. Se ha demostrado que modula la muerte celular inducida por patógenos, exposición al ozono, hipoxia y órgano-senescencia. Un papel primordial del etileno es alterar la expresión de varios genes diana, afectar la expresión de proteínas de defensa y de metabolitos secundarios (Rao *et al.*, 2002; Harfouche *et al.*, 2006). El etileno aumenta los niveles de transcripción de varios genes de defensa, los cuales incluyen a quitinasa y β -1,3 glucanasa, peroxidasa, chalcona sintasa, genes relacionados con patogénesis, genes relacionados con la maduración, genes de biosíntesis de etileno, así como genes de cisteína proteinasa (Wu & Bradford, 2003; Harfouche *et al.*, 2006). Algunas investigaciones (Penninckx *et al.*, 1998; Broekaert *et al.*, 2006) señalan que el etileno puede funcionar independientemente o con el ácido salicílico y el ácido jasmónico en la activación de la respuesta hipersensible, que desencadena una respuesta duradera conocida como Resistencia Sistémica Adquirida para proporcionar inmunidad contra futuras infecciones causadas por un amplio espectro de patógenos. Así, la planta crea una defensa a nivel sistémico en todos los órganos de la planta (Harfouche *et al.*, 2006; Rangel *et al.*, 2010).

La biosíntesis de etileno se inicia una vez el patógeno representa un desafío para los tejidos vegetales, lo que desencadena una mayor producción de etileno (Boller, 1991; Cohn & Martin, 2005), el etileno se sintetiza a partir del aminoácido metionina, que se asocia a la adenosina conformando la S-adenosil-metionina por medio de la enzima S-adenosil-metionina sintasa. El paso siguiente es la conversión de este intermediario en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico por medio del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa, el precursor del etileno. El cual se desdobla en etileno por medio de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa junto con la liberación de cianuro y dióxido de carbono (Broekaert *et al.*, 2006). Este ciclo metabólico es importante, pues recicla la metionina, un aminoácido no abundante, como fuente de azufre (Jordán & Casaretto, 2006). En consecuencia,

se puede observar que el gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa está relacionado directamente en la biosíntesis del etileno, pues es este gen el que codifica la última enzima necesaria en la síntesis del etileno. Sin embargo, la relación del gen DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP con la biosíntesis del etileno, no está clara. Se sabe que forma parte de una gran familia de proteínas (las DEAD-box ARN helicasas) la cual desempeñan roles importantes en los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, mediante la regulación de algunas vías metabólicas, incluyendo la del etileno (Rocak & Linder, 2004; Vashisht & Tuteja, 2006; Matthes *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Marín-Colorado, 2015).

6.6 Regiones promotoras

Los estudios de promotores que regulan en gran medida la expresión génica a nivel transcripcional son esenciales para mejorar nuestra comprensión básica de la regulación génica (Hernandez-Garcia & Finer, 2014). La regulación transcripcional tiene una función muy importante, la activación y supresión de la expresión de genes, y se controla en gran medida a través de promotores de genes y sus motivos *cis* (Zou *et al.*, 2011). En los términos generales, los promotores de genes son secuencias de ADN ubicadas aguas arriba del codón de inicio de un gen y contienen motivos *cis* de acción múltiple, que son sitios de unión específica para las proteínas involucradas en el inicio y la regulación de la transcripción (Hernandez-Garcia & Finer, 2014). Estos motivos *cis* determinan la expresión espacial y temporal de los genes, y se constituyen de pequeñas secuencias de ADN de entre aproximadamente 5 a 25 pares de bases (Ibraheem *et al.*, 2010). Algunos de sus roles son la regulación de procesos biológicos, como el desarrollo, el crecimiento, la división celular y las respuestas a los estímulos ambientales, entre otros (Himani *et al.*, 2014). Por lo tanto, la identificación de motivos reguladores en las regiones promotoras, es un paso importante para mejorar la comprensión de la expresión y regulación génica.

Los promotores de genes que codifican proteínas a menudo contienen un "promotor

central", el cual suele estar ubicado a aproximadamente 40 pares de bases aguas arriba del sitio de iniciación transcripcional y que comprende la caja TATA, esta caja es el sitio de unión para la subunidad del factor de transcripción IID (TFIID), el TFIID desempeña un papel central en el inicio de la transcripción del ARN polimerasa II (Hernandez-Garcia & Finer, 2014; Louder, *et al.*, 2016). Por lo cual, una comprensión completa del sistema de regulación del gen transcripcional dependerá de los análisis funcionales exitosos de los elementos que actúan en los motivos *cis*.

7. METODOLOGÍA Y ÁREA DE ESTUDIO

7.1 Evaluación fenotípica

Para la evaluación del ataque del ácaro verde a la yuca, se diseñaron ensayos a libre y no libre escogencia en donde se evaluaron la oviposición del ácaro sobre los dos genotipos de yuca seleccionados, tanto para el ensayo a libre y no libre escogencia se realizaron dos observaciones (9AM y 3PM) diarias durante cinco días. El experimento se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de los Llanos, siguiendo la metodología de evaluación de los lóbulos de cada genotipo en cajas de Petri (Marín-Colorado, 2015).

7.1.1 Material biológico

Se utilizaron dos genotipos de yuca, CMC-40 y ECU-72, los cuales presentan respuestas contrastantes frente al ataque ácaro verde, susceptible y resistente, respectivamente. Se propagaron en cultivo *in vitro* en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de los Llanos alrededor de 30 plántulas bajo condiciones de temperatura (25 ± 2 °C), humedad relativa (70 ± 5 %) y fotoperiodo (12 horas) controladas durante tres meses, también se utilizaron 30 estacas de cada genotipo que fueron sembradas en bolsas con tierra abonada y posteriormente trasplantadas en campo. Las plantas del cultivo *in vitro* al igual que las estacas fueron sembradas en bolsas con tierra abonada, y solo las estacas fueron utilizadas en la infestación con el ácaro verde donde se evaluó su resistencia y susceptibilidad.

7.1.2 Colecta del ácaro verde

La colecta de individuos de ácaro verde se realizó mediante la recolección de hojas de yuca que tuvieran la presencia del ácaro verde, una vez colectada un gran número de hojas, se llevaron al laboratorio para infestar plantas de yuca preparadas para la cría del ácaro verde. La ubicación de colecta fue en el municipio de San Luis de Cubarral (03° 47' 22,2"; 73° 50' 37,9").

7.1.3 Libre escogencia

Los ensayos se realizaron en cajas de Petri (150 mm x 15 mm) con una espuma humedecida con agua para prolongar la vida de los lóbulos utilizados, estos se distribuyeron de a cinco lóbulos de CMC-40 y cinco lóbulos de ECU-72 de forma intercalada para un total de diez lóbulos, en el medio se pusieron ácaros verdes para realizar la evaluación a libre escogencia de la oviposición de los mismos (Figura 1a), se utilizaron en total seis cajas de Petri para un total de 30 repeticiones de lóbulos por genotipo (Figura 1b).

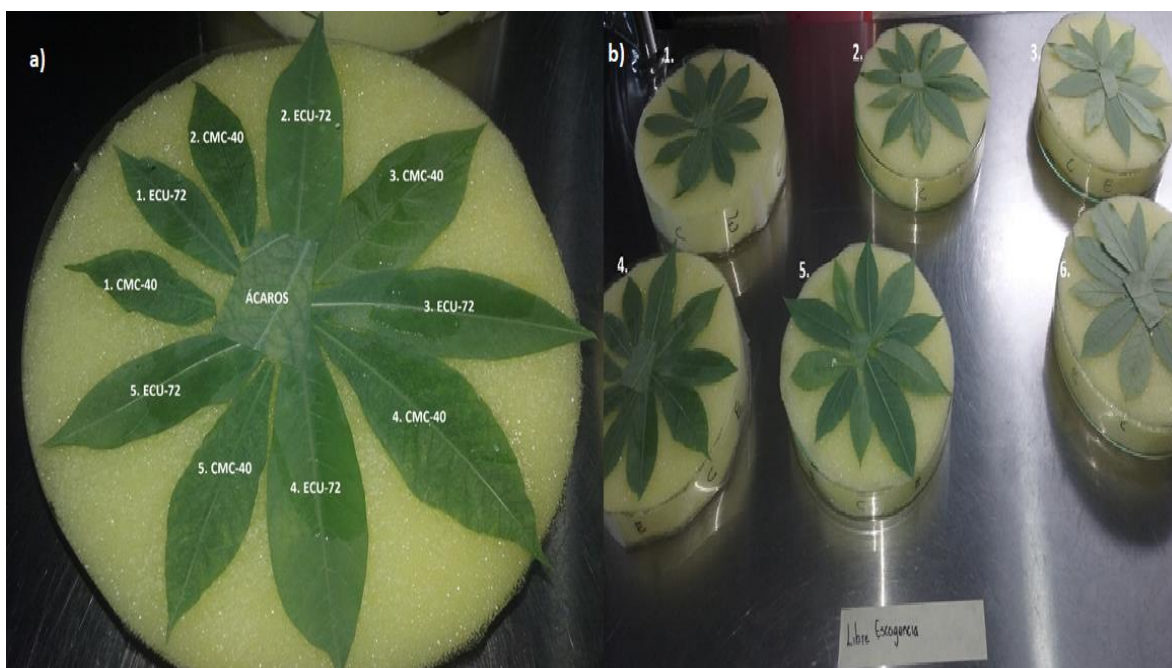


Figura 1. Diseño del experimento a libre escogencia. a), caja de Petri con cinco lóbulos de CMC-40 y cinco lóbulos de ECU-72 intercalados para un total de diez lóbulos. b), seis cajas de Petri con un total de 30 repeticiones de lóbulos por genotipo.

7.1.4 No libre escogencia

En el ensayo a no libre escogencia, el ácaro verde se enfrentó a ambos genotipos de forma independiente, por cada caja de Petri había diez lóbulos del mismo

genotipo ECU-70, de la misma manera se realizó con el genotipo CMC-40. Se utilizaron tres cajas de Petri por genotipo para un total de 30 repeticiones de lóbulos por cada genotipo (Figura 2).



Figura 2. Diseño del experimento a no libre escogencia. Seis cajas de Petri con diez lóbulos, de las cuales tres cajas contienen lóbulos ECU-72 y tres cajas contienen lóbulos CMC-40 para un total de 30 repeticiones de lóbulos por cada genotipo.

7.1.5 Análisis estadístico

Se realizó análisis estadístico de la oviposición por medio de un gráfico de cajas y bigotes para observar la distribución de los datos, si los datos no presentan una distribución homogénea se realiza la prueba de rangos de Wilcoxon utilizando software estadístico R, el cual nos permite comparar el rango medio de dos muestras relacionadas y determinar si las diferencias entre ellas se deben al azar o no. Para esta prueba se manejaron dos hipótesis:

H₀: La variable oviposición tiene la misma distribución en los dos genotipos (las medianas son iguales).

H₁: En una población, la oviposición tiende a dar valores mayores que en la otra (las medianas son diferentes).

7.2 Análisis molecular de la interacción planta-ácaro

7.2.1 Análisis *in silico*

7.2.1.1 Búsqueda de genes con el software Genevestigator

Genevestigator es un paquete de software el cual tiene herramientas basadas en web que proporcionan información cuantitativa categorizada sobre genes contenidos en grandes bases de datos de microarrays. Este software, disponible desde el año 2004, se ha venido actualizado para permitir consultas más rápidas, más potentes y más diversas para el análisis de función de genes (Zimmermann *et al.*, 2005). El programa permite buscar genes de interés y de referencia en los principales organismos modelo, entre ellos se encuentra *Arabidopsis thaliana*. El propósito de realizar una búsqueda de genes de interés, es permitirnos obtener genes adicionales que estén relacionados con el etileno de acuerdo a los niveles de expresión reportados en Genevestigator, asimismo, de verificar la expresión de los genes de interés en una amplia variedad de contextos, lo que nos conduce a nuevas ideas para diseñar experimentos y respaldar las decisiones informadas.

En la búsqueda de genes de defensa relacionados con la vía del etileno, se escogió *A. thaliana* por ser el organismo modelo por preferencia para las plantas, se refinó la selección por condiciones como perturbaciones bióticas, donde se pudo comparar varios experimentos relacionados con el tema de estudio de interés, en este caso se escogieron los trabajos reportados con artrópodos plaga en la planta *A. thaliana*. En los experimentos evaluados, estaban relacionadas los siguientes artrópodos plaga: *Bemisia tabaci* (mosca blanca), *Liriomyza huidobrensis* (mosca minadora) y *Myzus persicae* (pulgón del melocotonero).

7.2.1.2 Diseño de primers

El diseño de primers es uno de los aspectos más importantes de la PCR, primers mal diseñados pueden amplificar otros fragmentos de ADN distintos a los deseados (amplificación inespecífica), por tal motivo primero se realizó un BLASTn en el portal de genomas de Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov>), debido a que las secuencias de los genes provienen del genoma de *Arabidopsis thaliana*. Una vez obtenidas las secuencias de los genes de interés en el genoma de la yuca, se procedió al desarrollo de los primers (Tabla 2), el cual se realizó con la herramienta Primer 3 (<http://primer3.ut.ee>). Finalmente, con los primers recién diseñados se procedió a asegurar que los primers fueran complementarios a la región de interés del genoma de la yuca.

Tabla 1. Primers diseñados que amplifican un fragmento de los genes 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa, DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP y Protochlorophyllide reductasa A en yuca.

| Gen | Primer | Amplicón | Tm | Forward | Reverse |
|---|--------|----------|-------|--------------------------|--------------------------|
| 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa | ACO4 | 430 pb | 62 °C | AACATCGCTC AAGTCCCTGA | GGCACATCAA TCCACTGGTC |
| DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP | DBRH20 | 590 pb | 59 °C | GTTGCCTGCC ATAGTCCATG | ATCTGCCTCA TCCAACACCA |
| Protochlorophyllide reductasa A | PORA | 346 pb | 63 °C | AGCAAGTCCA GCAGTCAACA | AGTAGGTTCC TTGGCGGTTG |

7.2.1.3 Caracterización estructural de las regiones promotoras

La caracterización estructural de las regiones promotoras es de vital importancia, puesto que allí es donde se controla la expresión del gen mediante la regulación de la unión de los factores de transcripción para reclutar ARN polimerasa (Latchman, 1997). De modo que, cada región promotora de determinado gen contiene una combinación única de motivos *cis*, los cuales regulan procesos biológicos y

respuestas a diferentes factores bióticos y abióticos (Ibraheem *et al.*, 2010), en conclusión, es una herramienta adicional que se utiliza para confirmar la relación de los genes con mecanismos de defensa (Peramuna *et al.*, 2018).

7.2.1.3.1 Búsqueda y alineamiento de secuencias

La búsqueda de las secuencias de los genes (1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa, DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP y Protoclorofilida reductasa A) en el genoma de la yuca se realizó por medio de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos de Phytozome, debido a que en un inicio solo contamos con las secuencias de dichos genes en el genoma de *Arabidopsis thaliana*. A continuación, se realizó un alineamiento de las secuencias de ambos genomas (*A. thaliana* y *M. esculenta*) con en el software MEGA7, en donde se utilizó la herramienta de alineamiento Clustal W, para el árbol filogenético se utilizó el método de Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 y se escogió el modelo de poisson.

7.2.1.3.2 Búsqueda de promotores

Se realizó una búsqueda de las regiones promotoras por medio de la herramienta JBrowser de la plataforma Phytozome, para esto se seleccionaron 1500 pares de bases aguas arriba del codón de inicio de cada gen. El análisis *in silico* se realizó por medio de la plataforma online PlantCARE de bioinformatics & Systems Biology (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), la cual nos permite encontrar motivos *cis* putativos (Lescot *et al.*, 2002).

7.2.2 Análisis de expresión de genes

Se evaluaron dos genes los cuales se obtuvieron a partir de los resultados obtenidos por Marín-Colorado (2015) (1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa y DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP), adicionalmente, se evaluó un tercer gen el cual se obtuvo por medio de una búsqueda de genes mediante el software

Genevestigator (Protochlorophyllide reductasa A). Esta evaluación se realizó por medio de la técnica de PCR convencional, se utilizó el ensayo a no libre escogencia, donde se evaluaron tres estados de la interacción, el primer estado consta de un tiempo de cero horas (como control negativo de la interacción), el segundo estado consta de un tiempo de 24 horas y el tercer estado consta de un tiempo final de cuatro días de interacción con el ácaro.

7.2.2.1 Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó con 100 mg de material vegetal mediante el uso de un kit de extracción comercial, en este caso el kit que se usó fue: InviTrap Spin Plant RNA Mini Kit, para esto se siguieron las indicaciones del fabricante. En total se utilizaron seis muestras de ARN para los análisis (Tabla 3).

7.2.2.2 Cuantificación y gel de calidad

Las muestras de ARN extraídas se cuantificaron mediante el uso del espectrofotómetro Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader de BioTek. Los geles de agarosa se realizaron al 1,5 %, se corrieron en una cámara de electroforesis con una configuración de 150 voltios durante 30 minutos, los geles se visualizaron por medio del transiluminador E-Gel Imager de Thermofisher.

7.2.2.3 Síntesis de ADNc

Se realizó síntesis de ADNc a partir de muestras de ARN con una concentración de 500 ng/ μ L, para esto se utilizó el kit comercial ProtoScript First Strand cDNA Synthesis. Es necesario mencionar que para obtener mejores resultados se recomienda realizar digestión de ADN mediante el uso de DNAsas, sin embargo, no se realizó la digestión por falta de DNasa en el laboratorio. Para la síntesis se tomó 7 μ L de ARN, se agregó 3 μ L de oligo d(T)₂₃ VN [50 μ M] y se desnaturalizó a 70 °C durante 5 minutos, las muestras se pusieron sobre hielo y luego se adicionó 10 μ L de M-Mulv Reaction Mix [2X] y 2 μ L de M-Mulv Enzyme Mix [10X], luego se incubaron a 42 °C durante una hora y se inactivó la enzima a 80 °C durante 5

minutos. Por último, se diluyó la muestra a 50 µL mediante la adición 28 µL de agua libre de nucleasas.

7.2.2.4 PCR

La PCR se realizó en un termociclador MultiGene OptiMax Thermal Cycler, este se llevó a cabo por medio de la preparación de un cóctel de 12.5 µL (Tabla 2), la configuración del termociclador fue la siguiente: un ciclo de desnaturalización a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de alineamiento y de extensión de la cadena a, 94°C por 30 segundos, la temperatura del primer por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos, y una extensión final de 72 °C por 5 minutos. Se tomó como gen de referencia el gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) (F: 5'-CCGTGTTCCAACCTGTTGATG-3', R: 5'-CTGCACACCCACCAGAGTAA-3', longitud del producto: 190 pb, Tm: 58 °C), el cual es un gen constitutivo no implicado en respuestas de defensa y por tanto su nivel de expresión se mantiene constante durante los tiempos (Contreras & López, 2008).

Tabla 2. Reacciones del cóctel preparado para la amplificación de los genes por PCR.

| Cóctel | 1x |
|--------------------------|----------------|
| Buffer 10x | 1.25 µL |
| dNTP's solution mix 10mM | 0.25 µL |
| Primer F 10µM | 0.625 µL |
| Primer R 10µM | 0.625 µL |
| MgCl ₂ 50mM | 0.5 µL |
| H ₂ O | 7.75 µL |
| ADNc | 1.0 µL |
| Red Taq Polimerasa 1u/µL | 0.5 µL |
| Volumen total | 12.5 µL |

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Preferencia de oviposición

8.1.1 Libre escogencia

La figura 3 muestra que el genotipo CMC-40 presenta en los primeros dos días valores de oviposición superiores al genotipo ECU-72. A partir del tercer día el comportamiento es muy similar. Se observa ausencia de homocedasticidad. No fue posible realizar un contraste para la comparación de los grupos ya que no se pudo aplicar un análisis de comparación de medias, debido a la falta de homogeneidad de los datos, por ello se decidió aplicar la prueba de rangos de Wilcoxon el cual arrojó un valor de $p = 0.0002236$, de manera que al nivel de significancia de 5 % rechazamos la hipótesis nula, por lo tanto, podemos decir que la ovoposición es diferente en los genotipos evaluados.

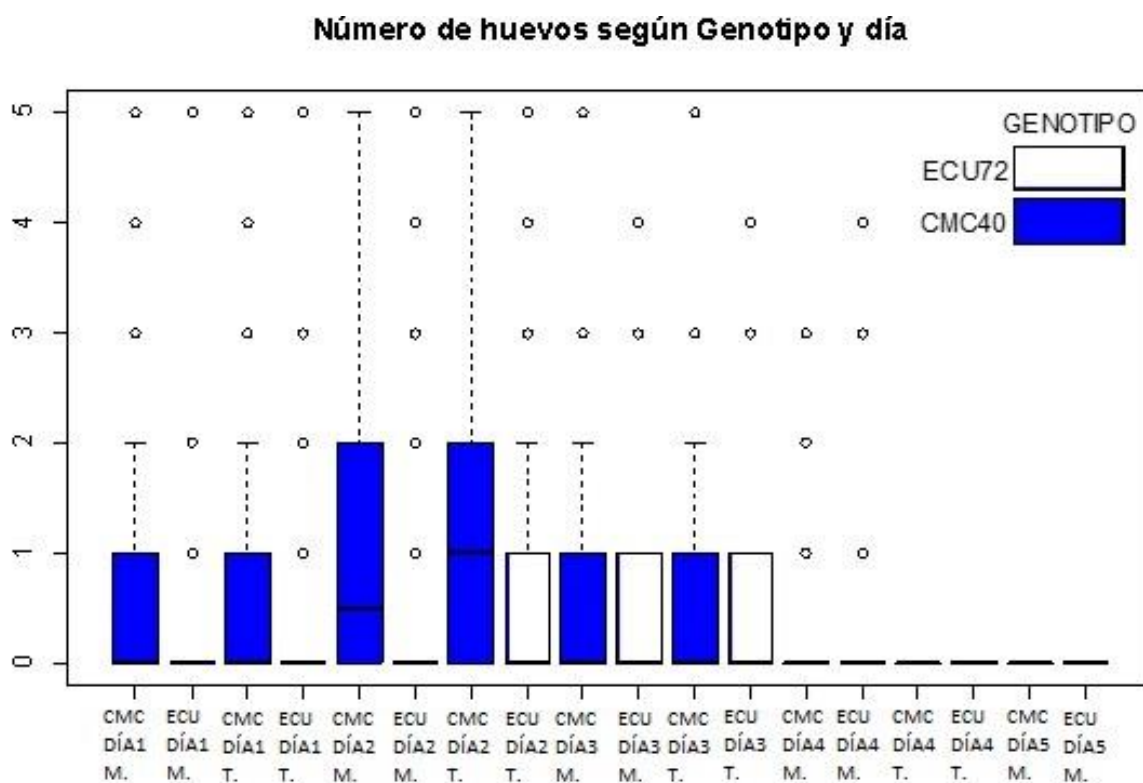


Figura 3. Modelo de cajas y bigotes. Número de huevos según genotipo y día, a libre escogencia.

Asimismo, se realizó una curva de oviposición (Figura 4), la cual presenta patrones similares en los dos genotipos, los valores muestran una culminación de la oviposición hacía el segundo día en la tarde (día 2T), desde entonces ocurre un descenso notable en el número de huevos. En los tres primeros días el promedio de huevos puesto en el periodo de observación es superior en el genotipo CMC-40, el valor de oviposición más alto fue 1.16.

Para apoyar estos resultados se plantearon varios modelos mixtos (teniendo en cuenta la correlación de los datos) con variable respuesta la oviposición (variable tipo conteo, por ello se usó el modelo Poisson) y de variables explicativas, el genotipo y el día. Los resultados muestran como el mejor modelo la función polinómica del tiempo en potencia dos con un coeficiente de -0.0984. En cuanto al genotipo, teniendo en cuenta el genotipo CMC-40 como referencia, se puede observar que el genotipo ECU-72 (coeficiente de -0.4470) presenta menor oviposición a través del tiempo, con un rango de diferencia de 0.6 - 1.16. Marín-Colorado (2015) encontró que a libre escogencia el rango de diferencia de oviposición era de 1.5 - 27.1, donde el genotipo CMC-40 presento mayor oviposición. Otra investigación (Strucker *et al.*, 2017) reporta diferentes genotipos de yuca: G-83, G-92, Amazonas, Recife, Pão, Cigana-preta y IAC-90 são, los cuales presentan menor preferencias de oviposición del ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*) sobre el genotipo AC-100.

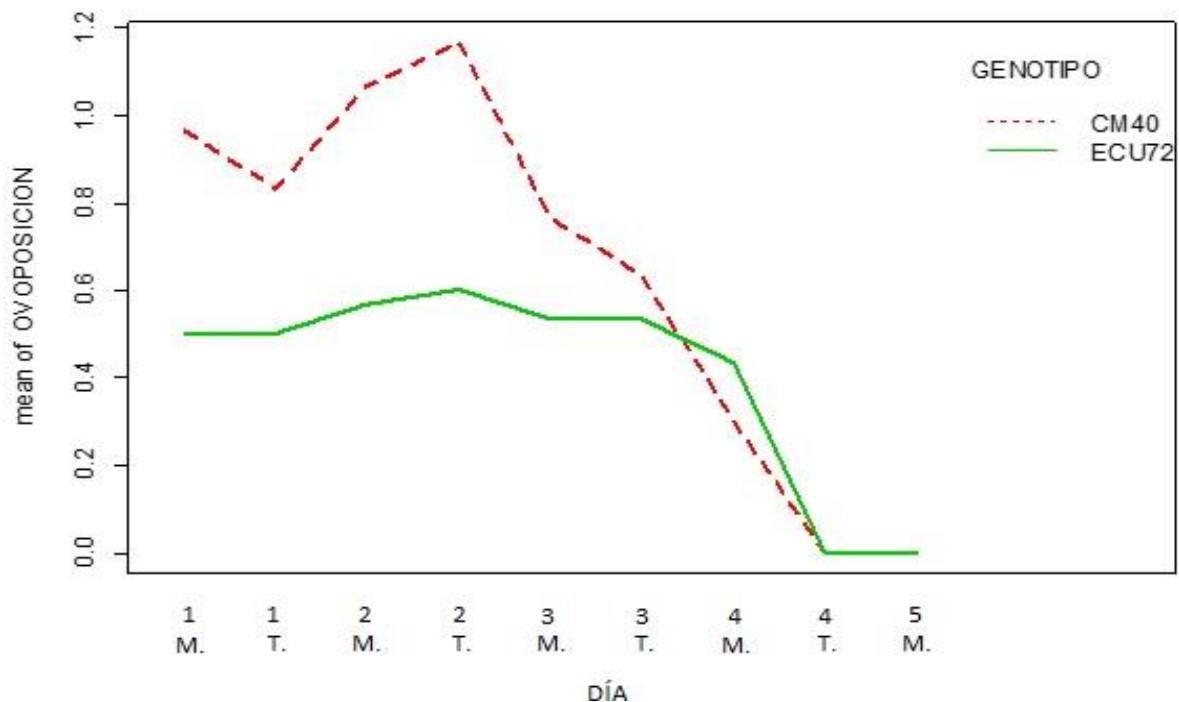


Figura 4. Curva de oviposición de los genotipos CMC-40 y ECU-72, a libre escogencia.

8.1.2 No libre escogencia

En la figura 5 se observa que el genotipo CMC-40 (verde) presenta en el primer día valores superiores al genotipo ECU-72. A partir del segundo día el comportamiento es muy similar. De nuevo se observa ausencia de homocedasticidad, por tal motivo se aplicó la prueba de rangos de Wilcoxon que arrojó un valor $p = 0.04992$. Al nivel de significancia de 5 % la prueba no es concluyente, responde al comportamiento global observado, mostrando diferencias en el primer día, pero luego el comportamiento es muy similar.

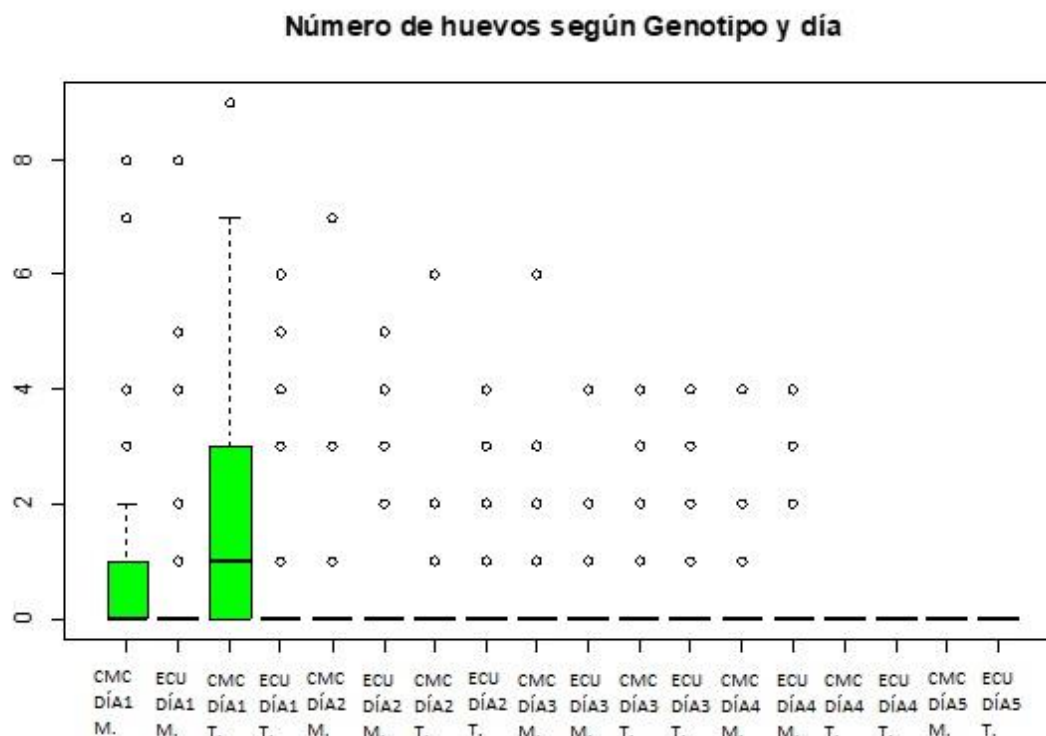


Figura 5. Modelo de cajas y bigotes. Número de huevos según genotipo y día, a no libre escogencia.

Igualmente se realizó una curva de oviposición (Figura 7), en la cual se observa que apoya las observaciones hechas anteriormente. A partir del segundo día se presenta un comportamiento de oviposición muy similar en los dos genotipos, el valor máximo de oviposición fue de 1.56 en el genotipo CMC-40.

Se plantearon varios modelos mixtos para tratar de analizar algunas diferencias, los resultados arrojan como el mejor modelo la función polinómica del tiempo en potencia dos con un coeficiente de -0.05634. En cuanto al genotipo, usando el genotipo CMC-40 como referencia, se puede observar que el genotipo ECU-72 (coeficiente=-0.29726) presenta menor oviposición a través del tiempo, pero esto se debe solo al primer día, donde el rango de diferencia fue de 0.66 - 1.56. En el experimento a no libre escogencia realizado por Marín-Colorado (2015) el rango de diferencia fue de 1.9 - 12.5. Estas preferencias de oviposición están influenciadas por la densidad de los tricomas presentes en las hojas de la yuca (Strucker *et al.*,

2017), de modo que el genotipo ECU-72 el cual tiene una mayor densidad de tricomas, presenta valores inferiores de oviposición.

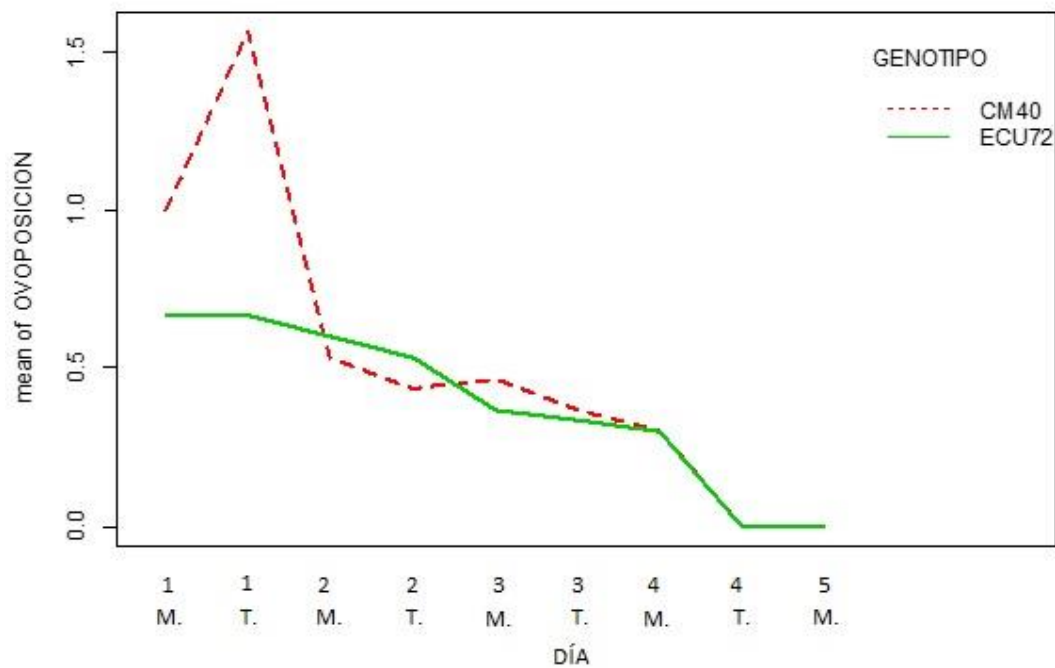


Figura 6. Curva de oviposición de los genotipos CMC-40 y ECU-72, a no libre escogencia.

8.2 Análisis molecular de la interacción planta-ácaro

8.2.1 Análisis *in silico*

8.2.1.1 Genes relacionados con la vía del etileno reportados en la base de datos de Genevestigator

En la búsqueda de genes relacionados con la vía del etileno se evaluaron diferentes experimentos reportados de interacciones planta-artrópodos plaga. El sistema de búsqueda que se utilizó, fue elegir dentro de los experimentos los genes que se reportan como sobre-regulados y reprimidos. En los experimentos evaluados de *Arabidopsis thaliana*, estaban relacionadas los siguientes artrópodos plaga: *Bemisia*

tabaci (mosca blanca), *Liriomyza huidobrensis* (mosca minadora) y *Myzus persicae* (pulgón del melocotonero). En total 21 experimentos fueron reportados para estas interacciones y se encontraron dos genes relacionados con la vía del etileno.

Los genes relacionados con el etileno que se encontraron fueron el gen PORA y el gen ERF6, específicamente en experimentos de la interacción de *A. thaliana* con *B. tabaci*. Para el caso de PORA, el gen se reportó con niveles reprimidos en la expresión génica, con un valor de Log2-ratio = -1.98 (Figura 7). Por otra parte, ERF6 también se reporta con niveles reprimidos en la expresión génica, con un valor de Log2-ratio = -0.67 (Figura 8). Es importante mencionar que estos genes se destacaron como resultados porque además de estar involucrados en la vía de señalización de etileno, presentaban uno de los dos niveles de expresión, sobre-regulación o reprimidos, sin embargo, solo se incluyó el gen PORA en el análisis estructural de promotores y en el análisis de la expresión génica, debido a que fue el gen que presentó el nivel mayor de expresión génica reprimida.

La identificación de genes que se expresan específicamente en ciertos tejidos o como respuesta a un estímulo ambiental es útil para diseñar futuras investigaciones en diferentes tipos de plantas, ya sea para generar marcadores de expresión génica o simplemente para comprender redes reguladoras de genes (Austin *et al.*, 2016). De modo que el uso de este software no solo es ideal para identificar genes expresados específicamente durante los estreses seleccionados, sino que también sirve para identificar genes en etapas de crecimiento o en órganos específicos (Zimmermann *et al.*, 2004).

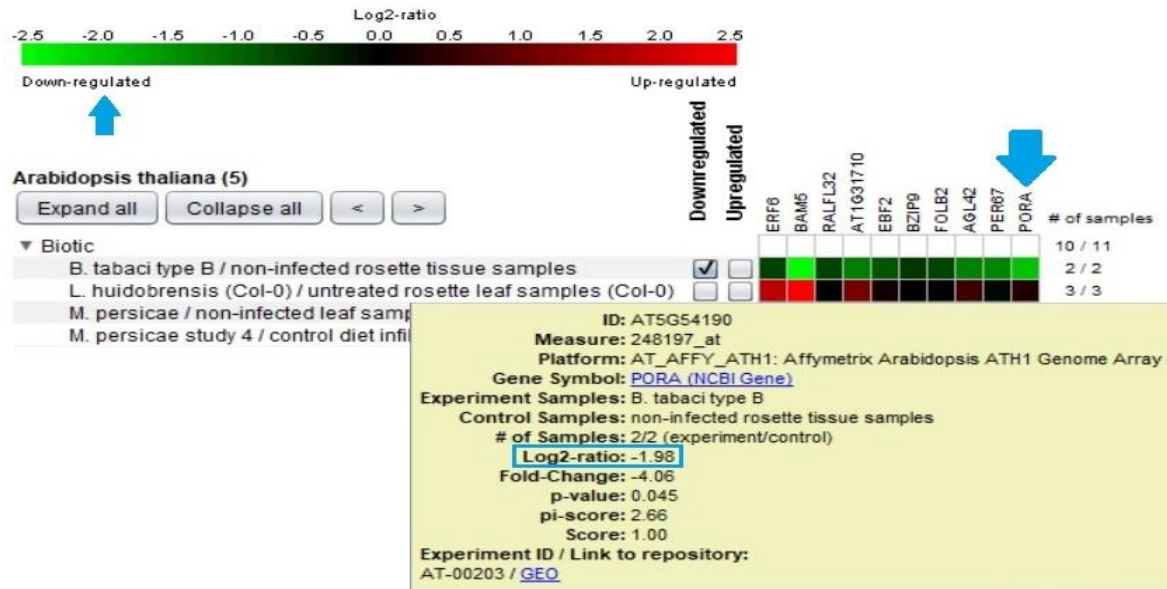


Figura 7. Gen PORA con niveles reprimidos de expresión génica en la interacción de *Arabidopsis thaliana* con *Bemisia tabaci*.

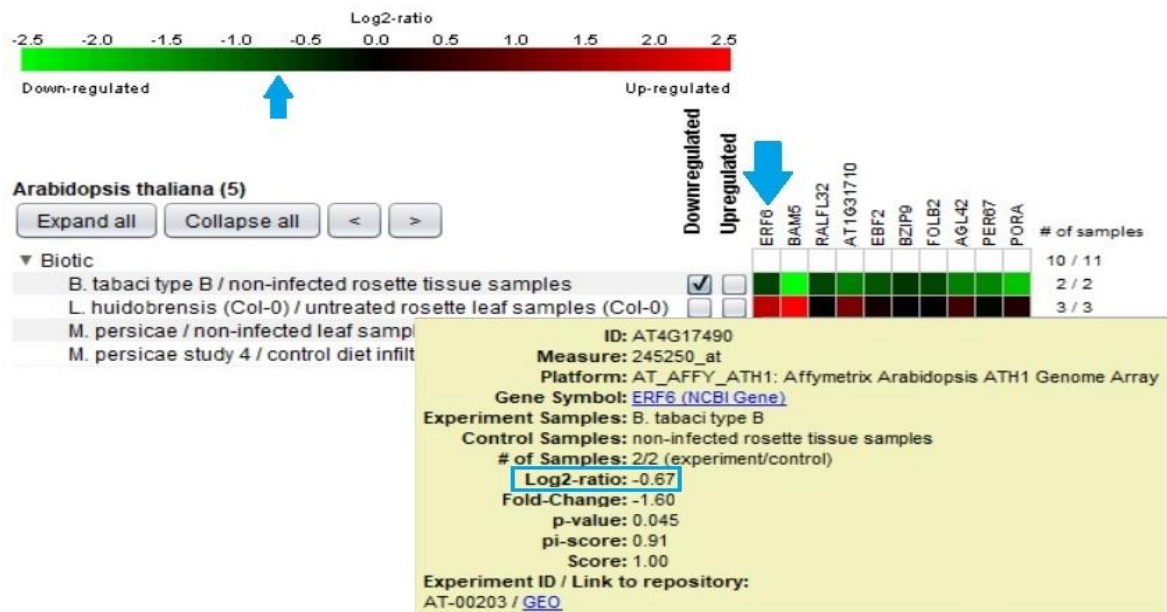


Figura 8. Gen ERF6 con niveles reprimidos de expresión génica en la interacción de *Arabidopsis thaliana* con *Bemisia tabaci*.

8.2.1.2 Caracterización estructural de las regiones promotoras

A partir de los genes de interés 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa, DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP y Protoclorofilida reductasa A, asociados a la vía de señalización del etileno, los cuales se obtuvieron a partir del genoma de *Arabidopsis thaliana* (base de datos de NCBI), se realizó un alineamiento BLASTn en línea (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!search?show=BLAST>) para obtener las secuencias en nuestra planta de interés *Manihot esculenta* (base de datos de Phytozome). Para el gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa se encontraron tres secuencias en yuca similares a la de *A. thaliana* (Figura 9).




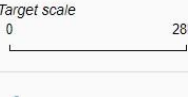


| Define | Score | E | Target View [click feature to view in JBrowse] | |
|----------------|-------|---------|---|---|
| ▶ Chromosome13 | 228.5 | 9.2E-58 |  |  |
| ▶ Chromosome16 | 201.5 | 1.3E-49 |  |  |
| ▶ Chromosome12 | 176.2 | 5.1E-42 |  |  |

Figura 9. Secuencias del gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa encontradas en yuca.

Una vez obtenidas las secuencias homologas de los genes de interés en el genoma de yuca, se realizó un alineamiento de las secuencias con el software MEGA7 para luego realizar un árbol Neighbor-Joining. Esto nos permitió por medio del índice de Bootstrap saber cuál de esas secuencias es la más similar o cercana a la secuencia original de *A. thaliana*. El árbol Neighbor-Joining arrojó que la secuencia que se encuentra en el cromosoma 16 de *M. esculenta* es la más similar a la secuencia de *A. thaliana* (Figura 10). Una vez encontrada la secuencia de yuca que más se asemeja a la secuencia de *A. thaliana*, el paso a seguir fue obtener los motivos *cis* putativos en la plataforma PlantCARE, para esto fue necesario conseguir la secuencia promotora por medio de la herramienta JBrowser en la base de datos de

Phytozome.

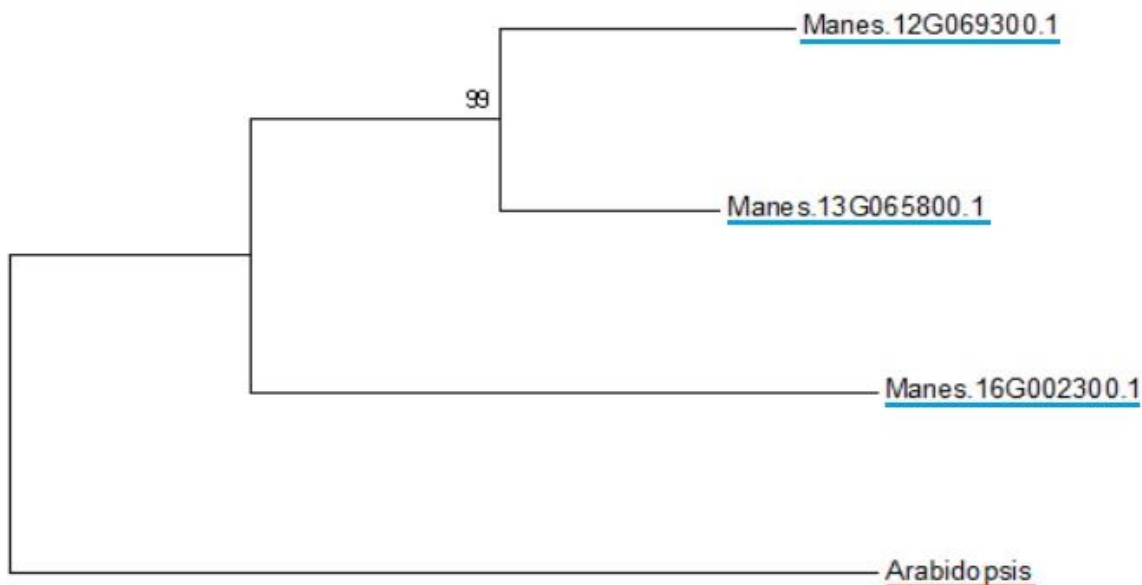


Figura 10. Árbol Neighbor-Joining de las secuencias de *Arabidopsis thaliana* y *Manihot esculenta* del gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa.

Se encontró que el promotor de *A. thaliana* contiene motivos *cis* putativos importantes (Figura 12), para esto se tuvo que ingresar la secuencia promotora (1500 pares de bases aguas arriba del codón de inicio del gen) obtenida por medio de la herramienta “JBrowse” de Phytozome en la plataforma en línea de PlantCARE. El motivo ABRE (TACGTG, TACGGTC), elemento involucrado en la respuesta del ácido abscísico ubicado en la posición -360 y -1249, el motivo ARE (TGGTTT) elemento esencial para la inducción anaeróbica ubicado en las posiciones -514, -1323, -635 y -1400, el motivo AuxRR-core (GGTCCAT) elemento involucrado en la respuesta de auxinas ubicado en la posición +525, el motivo CGTCA y el motivo TGACG elementos involucrados en la respuesta de metil jasmonatos ubicados en las posiciones -85 y +1443, +85 y -1443 respectivamente, el motivo ERE (ATTTCAAA) elemento involucrado en la respuesta del etileno ubicado en la posición +17, el motivo GARE (AAACAGA) elemento sensible a la giberelina

ubicado en la posición -1140, el motivo HSE (AAAAAATTTC) elemento involucrado en la respuesta al estrés por calor ubicado en las posiciones +12, -619, -395 y -849, el motivo TC-rich repeats (GTTTTCTTAC) elemento involucrado en la defensa y la respuesta al estrés ubicado en la posición -773, el motivo WUN (TCATTACGAA) elemento sensible a heridas ubicado en la posición -492 y varios motivos (ACE, ATCT, Box 4, Box I, G-Box, GA, GAG, L-box y TCT) involucrados en la respuesta a la luz (Figura 11).

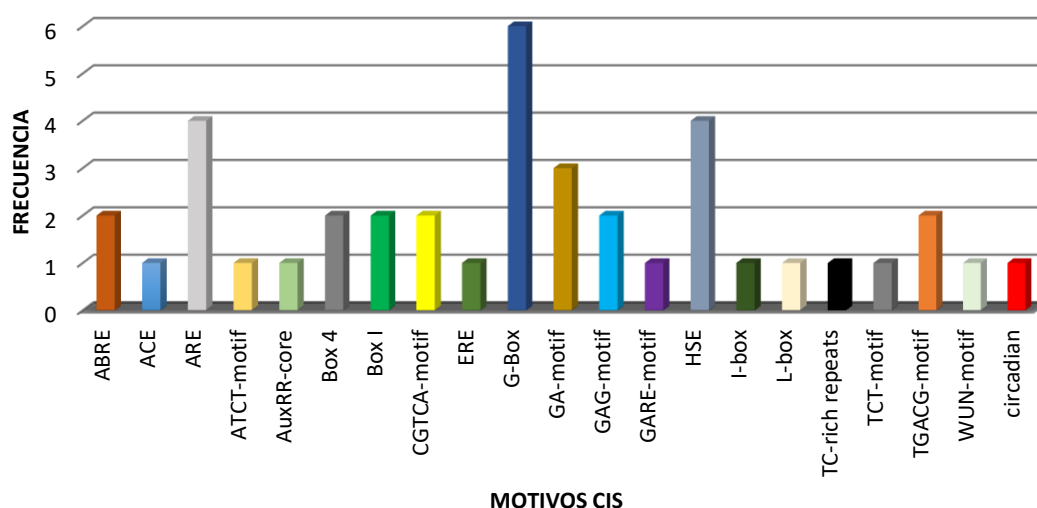


Figura 11. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa en *Arabidopsis thaliana*.

```

>userseq15356 1505nt your sequence is >1500nt.
+ TAGCAAATAT TAAATAATTT AAAATCAATA CATTAGTTGC CAAAACCCGT CTGTGATATT ATACTTTTTG
- ATCGTTTATA ATTCTTTAAA GTTTAGTATTAATTAACG GTTTTGGGCA GACACTATAA TATGAAAAAC
+ AGGCTCCATA ATAAAGACGT GAGATTTGTT TGTGACTGAG GAAGTGGAAA ATAAAGTTAA GCATGTCTTA
- TCCGAGGTAT TATTACTGCA CTCTAAACAA ACACCTGACTC CTTACACCTT TATTTCAATT CGTACAGAAT
+ CTATTATCAA ATATCAGTTT TTCTATAACA AAGTATGAAT GTTGATCAAA GACAAAAACA AAAAAAAGGT
- GATAATAGTT TATAGTCAAA AAGATATTGT TTCATACTTA CAACCTAGTTT CTGTTTTTGT TTTTTTTCCA
+ GATCCACCTT TCTCCAAATA GAAAGGAAGT AAGGCAATGA ATGTTTTTTT TTTTTTTTTC CATTGCATT
- CTAGGTGGAA AGAGGTTTAT CTTTCCTTCA TTCCGTTACT TACAAAAAAG AAAAAAAGGT GTAACGTAAA
+ GCTTTTAAAT CTTTATAAGA ATTTGAAAGA AAAATATCTT ATCAACTCTT AGAGGTGATC TTTGGGCCAA
- CGAAAATTTA GGAATATTCT TAACTTTCT TTTTATAGAA TAGTTGAGAA TCTCCACTAG AAACCCGGTT
+ AGAGGGAACC ACGTAATCGA ATCTGAACCT CTCCGCTTAA ATGGGAAATT TTATTAGATC TGATAAACGG
- TCTCCCTTGG TGCATTAGCT TAGACTTGAA GAGGCGAATT TACCCTTAA AATTAATCTAG ACTATTGGCC
+ CCAAAAGTGA TAGCTCATGA TTCTTAATAT AGACGTGCAT ACAGAGATGT TGTTACCGGC CGAAGAGCAG
- GGTTTTCACT ATCGAGTACT AAGAATTATA TCTGCACGTA TGCTCTTACA ACAATGGCCG GCTTCTCGTC
+ CTTCGTAATC AACGGACACA AATAAACCCAC TATTGGTCCA TC AAAAATTAA TACAAAACGA ATGAAAACCTG
- GAAGCATTAG TTGCCTGTGT TTAATTTGGT ATAACCAGGT AGTTTTTAAT ATGTTTTGCT TACTTTTGAC
+ CTGTGTCATA AGACTAAATA ATTTTGATA TTATTATGAT TTAGATGGAT GCGGTCTACA AATTTTTTTTA
- GACACAGTAT TCTGATTTAT TAAAACATAT AATAATACTA AATCTACCTA CGCCAGATTT TAAAAAATAT
+ ACAAAAACCA ACCATTAGTT TGTTTAAGTT ACTTGAAAAC AAGAAAAGGT TCAGTGAAAG GTGATATATA
- TGTTTTGGT TGTGAATCAA ACAAATCAA TGAACCTTTG TTCTTTTCCA AGTCACCTTC CACTATATAT
+ AGCTATTATT ATTATACACA GAGTAAAAGG AAGAAATGTG AAAAGGAAGA TTAATCCACA CTAAAAGTAA
- TCGATAATAA TAATATGTGT CTCATTTTCC TTCTTTACAC TTTTCCTTCT AATTAGGTGT GATTTTCATT
+ AAGGAAGAAA ACGGGTCAAA CAATGAATCG TCTGACTGAG TAATAATATA CGTCGCTGTC ATATATTTTG
- TTCCTTCTTT TGCCAGTTT GTTACTTAGC AGACTGACTC ATTATTATAT GCAGCGACAG TATATAAAAC
+ TATAACCATA AATTTTTTAT ATTTTTCCTG ACCCAAATTA TTTTATGTTT TCTATAGCTA GTTACTAAAT
- ATATTGGTATTTTAAAAATA TAAAAAAGGC TGGGTTAAT AAAAATCAA AGATATCGAT CAATGATTTA

```

Figura 12. Motivos *cis* putativos encontrados en el promotor de gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa en *Arabidopsis thaliana*.

Dentro del promotor del mismo gen en yuca se encontraron motivos *cis* compartidos con los de *A. thaliana* (ABRE, ARE, AuxRR-core, Box 4, Box I, G-Box, GA, HSE, TC-rich repeats), de los cuales se destaca el motivo TC-rich repeats, ya que es uno de los motivos involucrados en la defensa y en el estrés de la planta, los motivos ABRE Y AuxRR-core fundamentales por estar involucrados en la respuesta de las hormonas del ácido abscísico y de auxinas, sin embargo, en la región promotora de la yuca no se observaron motivos relacionados con el etileno. Al realizar un histograma de frecuencias de los motivos *cis* encontrados, se puede observar que los motivos involucrados con la respuesta de la luz son los más abundantes (Box 4 y G-Box), así como también el motivo HSE (Figura 13).

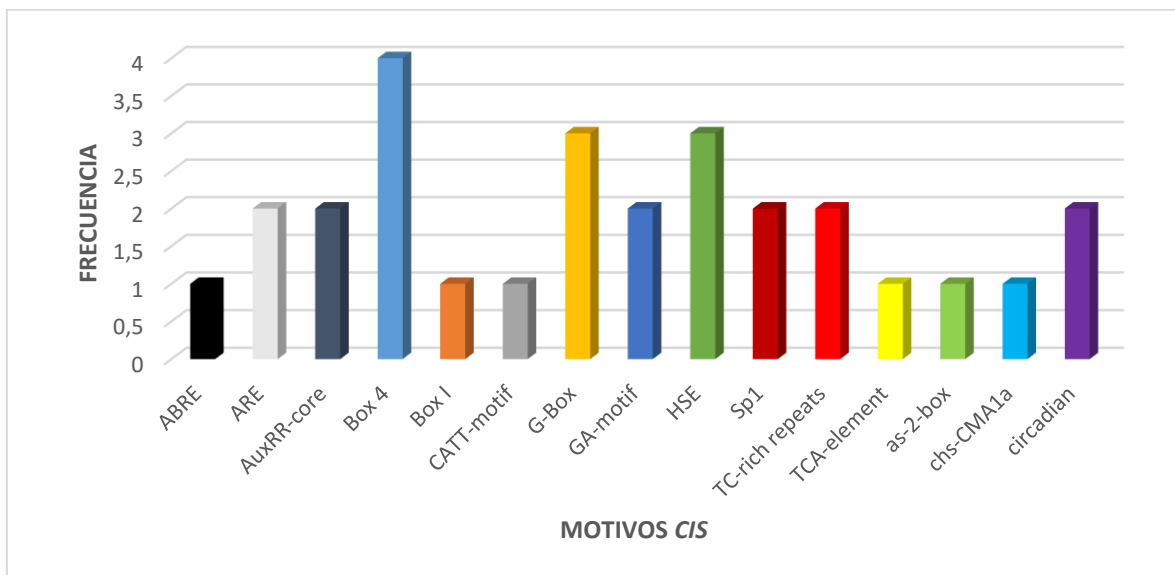


Figura 13. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa en el cromosoma 16 de *Manihot esculenta*.

En cuanto al gen DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP, el árbol Neighbor-Joining (Figura 14) muestra la secuencia del cromosoma 11 de la yuca y la secuencia de *A. thaliana* con un porcentaje Bootstrap del 100%, lo que significa que estas dos secuencias del gen son muy similares.

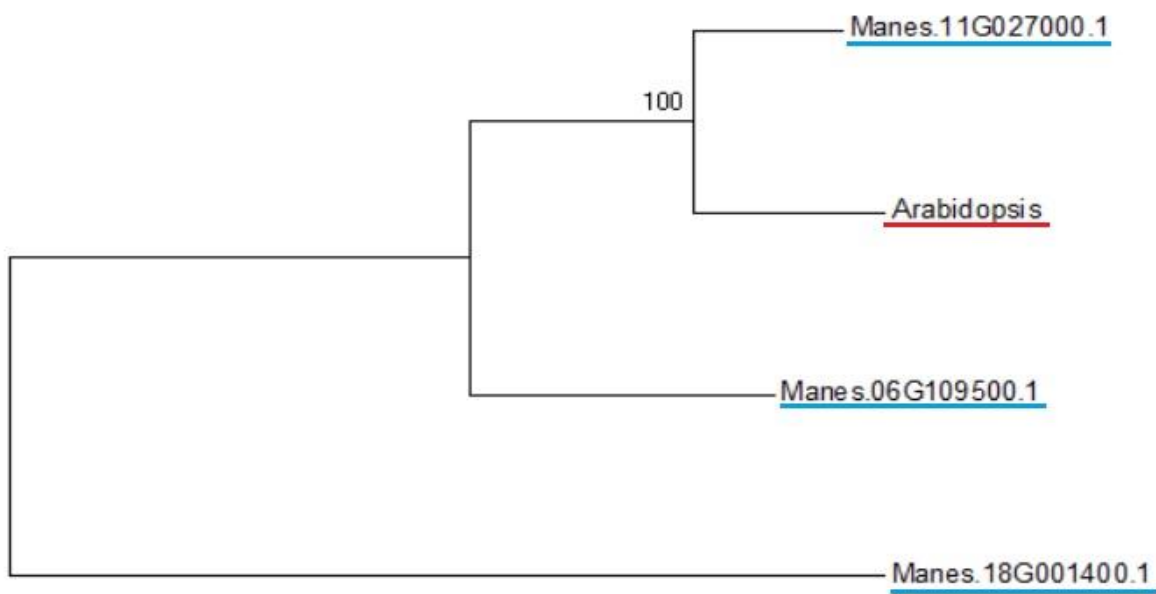


Figura 14. Árbol Neighbor-Joining de las secuencias de *Arabidopsis thaliana* y *Manihot esculenta* del gen DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP.

En la región promotora del gen DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP en *A. thaliana*, se sigue observando el mismo patrón en la frecuencia en que se encuentran motivos involucrados con la respuesta a la luz (G-Box), siendo los estos los más abundantes, el motivo GARE es otro tiene una frecuencia alta (3), siendo uno de los más importantes al ser un elemento sensible a las giberelinas (Figura 15). En esta región promotora se encuentran motivos importantes como los involucrados en la capacidad de respuesta al ácido abscísico (motivo ABRE -1280, +1281), los esenciales para la inducción anaeróbica (motivo ARE -847, -904), los involucrados en la respuesta de metil jasmonatos (motivo CGTCA -1243 y motivo TGACG +1243), los sensibles a las giberelinas (motivo GARE +306, -1301, -331 y motivo P-box -156), los involucrados en defensa y en respuesta al estrés (motivo TC-rich repeats +229) y los involucrados en la capacidad de respuesta al ácido salicílico (motivo TCA -294, +1013).

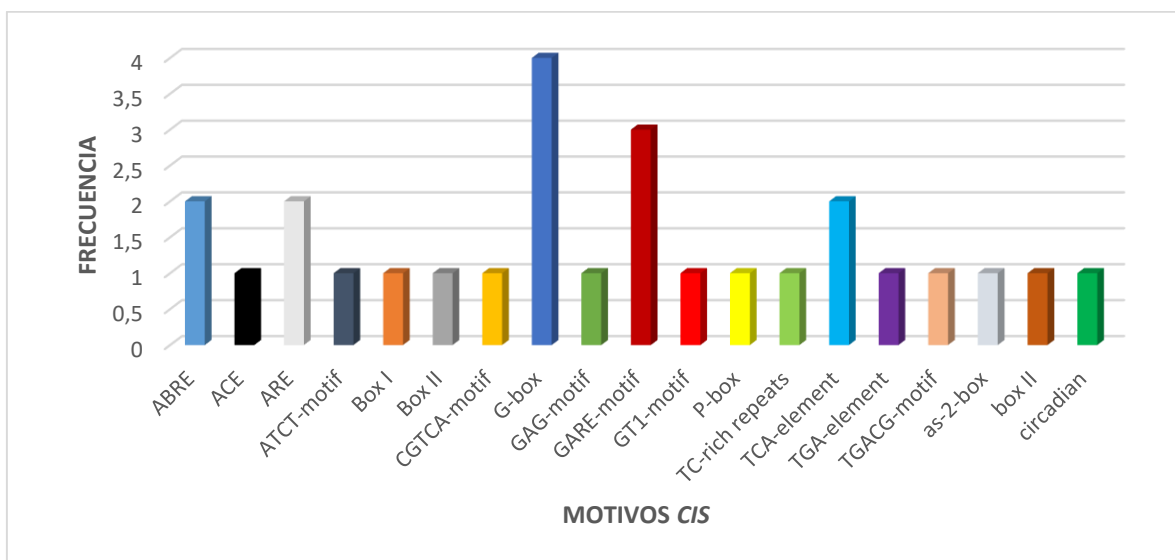


Figura 15. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP en *Arabidopsis thaliana*.

En cuanto a la región promotora del cromosoma 11 de *M. esculenta*, los motivos *cis* más abundantes fueron Box 4 (+527, -1158, +638), Sp1 (+23, -1259, +966) y TC-rich repeats (+178, -749, -213) con una frecuencia de 3 en cada motivo (Figura 16), involucrados en la respuesta a la luz (Box 4 y Sp1) y en la defensa y respuesta al estrés (TC-rich repeats). Otros motivos importantes presentes en esta región promotora fueron el motivo ARE (-1410) elemento esencial para la inducción anaeróbica, el motivo TGA-box (-844) elemento sensible a la auxina y el motivo TGACG (+830, -847) elemento involucrado en la respuesta de metil jasmonatos. Tanto en la región promotora de *A. thaliana* como en la de *Manihot esculenta*, no se observaron motivos relacionados con el etileno.

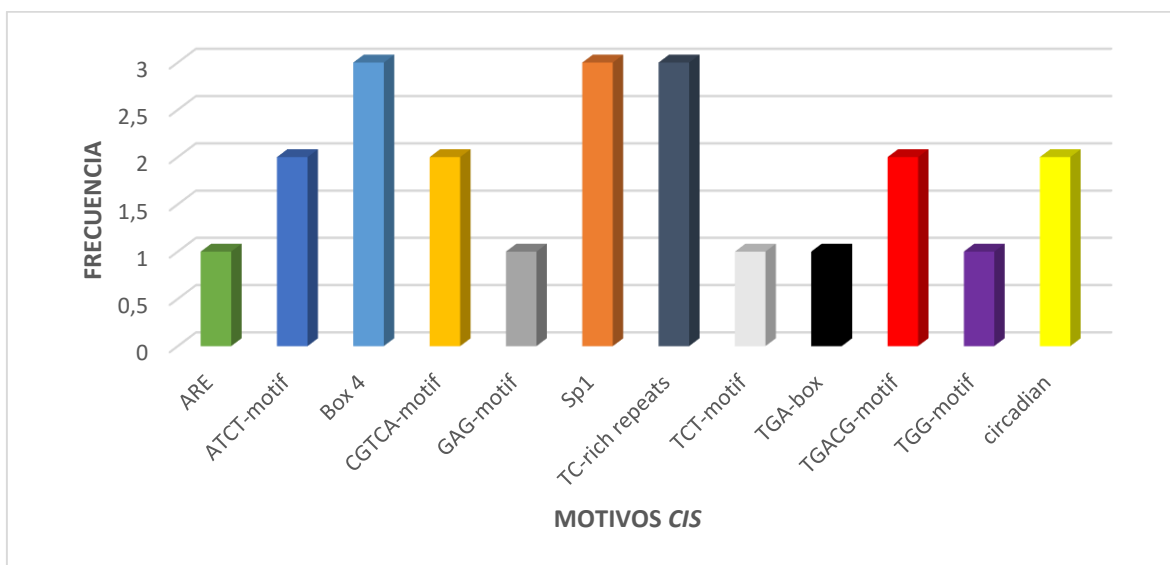


Figura 16. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP en el cromosoma 11 de *Manihot esculenta*.

En el árbol Neighbor-Joining del gen Protoclorofilida reductasa A (Figura 17) se observa que tanto la secuencia del cromosoma 3 y del cromosoma 15 de *M. esculenta* están cercanas a la de *A. thaliana* con un Bootstrap del 89 %, sin embargo, el BLASTn realizado en la plataforma en línea de Phytozome (Figura 18) señala que la secuencia del cromosoma 3 es la más similar a la secuencia original de *A. thaliana* con un Score de 464.8 (Figura 18).

Con respecto al análisis *in silico* de la región promotora del gen Protoclorofilida reductasa A en *A. thaliana* se encuentra el motivo G-box con la frecuencia más alta (3) involucrado en la respuesta a la luz, ahora bien, dentro de los motivos importantes involucrados en la defensa y en la respuesta al estrés encontramos de nuevo el motivo TC-rich repeats en la posición -517, el motivo ARE elemento esencial para la inducción anaeróbica en la posición -764, el motivo CGTCA y el motivo TGACG involucrados en la respuesta de metil jasmonatos en las posiciones -316, +448 y +316, -448 respectivamente, el motivo HSE involucrado en la respuesta al estrés por calor en la posición +1338, el motivo LTR involucrado en la

respuesta a bajas temperaturas en la posición -130 y el motivo TCA involucrado en la capacidad de respuesta al ácido salicílico en las posiciones +935 y -1243 (Figura 19).

En la región promotora del cromosoma 3 de *M. esculenta*, los motivos más frecuentes son G-box y HSE, involucrados en la respuesta a la luz y en la capacidad de respuesta al estrés por calor respectivamente (Figura 20), otro motivo importante que se encontró es el motivo LTR que está involucrado en la respuesta a baja temperatura y se encuentra en la posición -167. Volvemos a notar que ni en la región promotora de *A. thaliana* ni en la de *M. esculenta* aparecen motivos involucrados con el etileno.

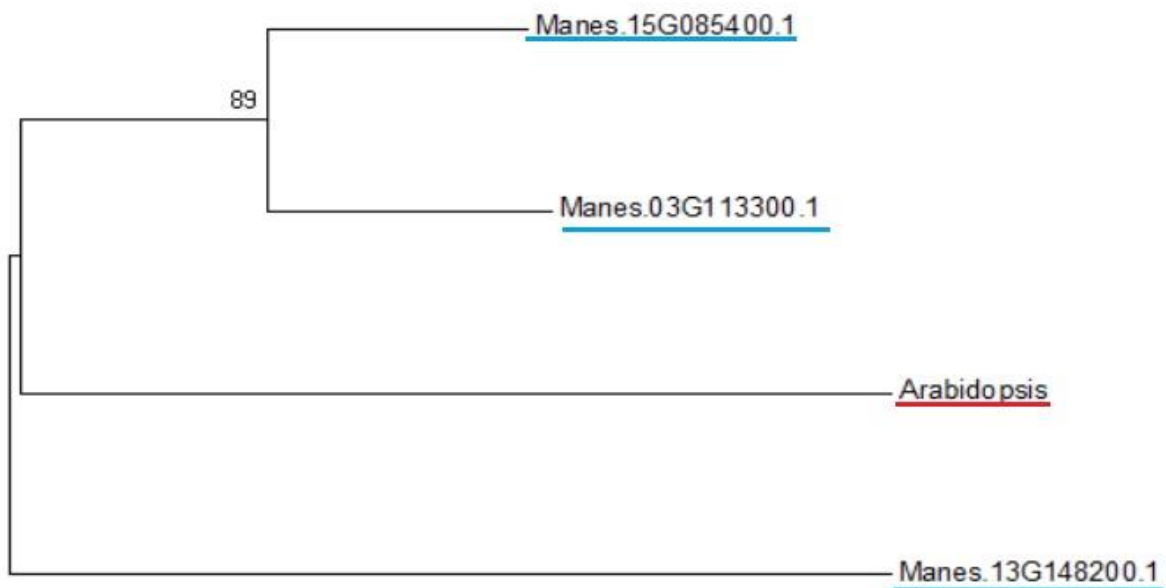


Figura 17. Árbol Neighbor-Joining de las secuencias de *Arabidopsis thaliana* y *Manihot esculenta* del gen Protoclorofilida reductasa A.

| Define | Score | E | Target View [click feature to view in JBrowse] | |
|----------------|-------|----------|--|---------------------------|
| ▶ Chromosome03 | 464.8 | 8.8E-129 | Feature scale 1000.0 | Target scale 0 29M |
| ▶ Chromosome15 | 302.4 | 6.4E-80 | Feature scale 1000.0 | Target scale 0 26M |
| ▶ Chromosome13 | 293.4 | 3.3E-77 | Feature scale 1000.0 | Target scale 0 28M |

Figura 18. Secuencias del gen Protoclorofilida reductasa A encontradas en *Manihot esculenta*.

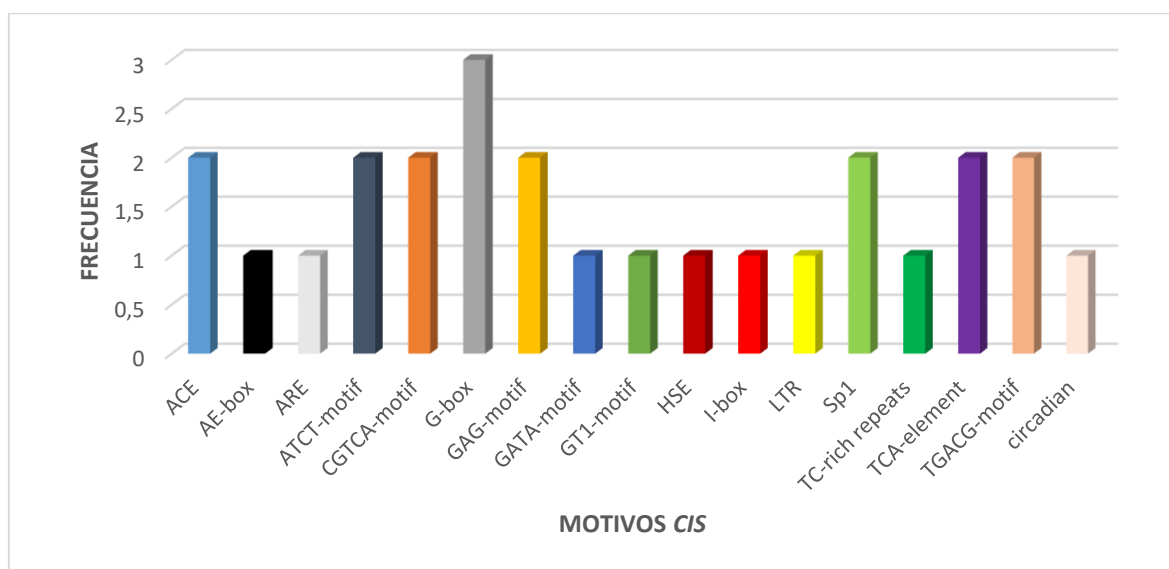


Figura 19. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen Protoclorofilida reductasa A en *Arabidopsis thaliana*.

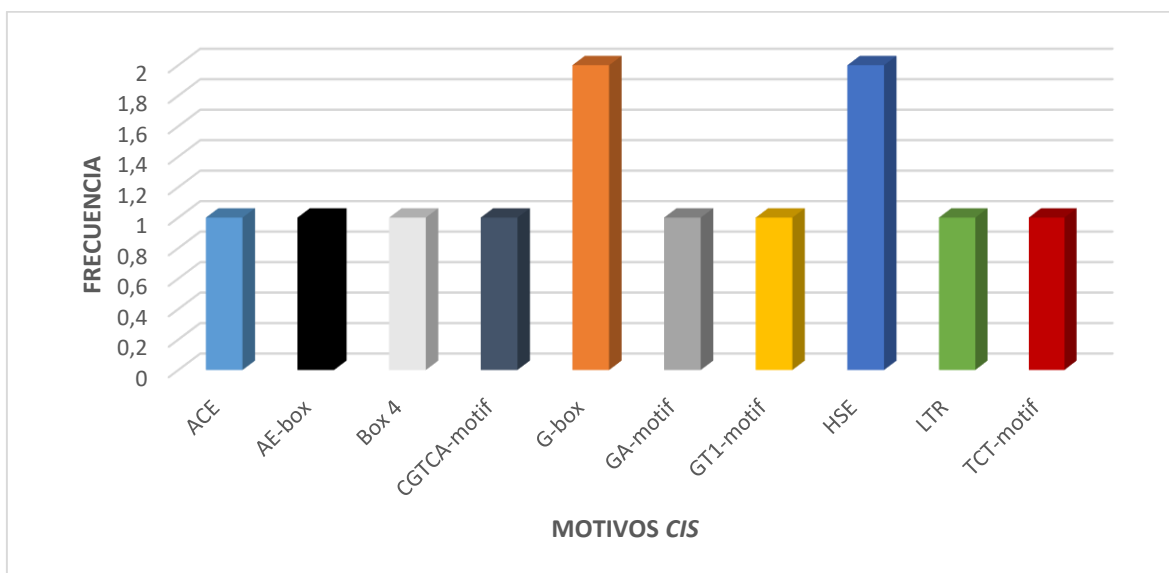


Figura 20. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen Protoclorofilida reductasa A en el cromosoma 3 de *Manihot esculenta*.

Se sabe que el etileno es una fitohormona gaseosa que regula el crecimiento y el desarrollo de las plantas, con este análisis estructural de promotores podemos ver que se presentan motivos *cis* implicados en respuesta de defensa a patógenos y herbívoros, en procesos de respuesta a factores de estrés a heridas, respuesta a bajas temperaturas y respuesta a estrés por calor. En adición, diferentes líneas de evidencia indican que el etileno interacciona con el ácido salicílico, ácido abscísico, jasmonatos, auxinas y giberelinas (Arimura *et al.*, 2002). Se asume que el etileno estaría relacionado con la acción de auxina dado que, en presencia de ésta, el etileno incrementa sus efectos más allá que el generado por la propia auxina, aunque se admite que por su forma gaseosa, puede llegar a zonas adyacentes más rápidamente donde la auxina no puede acceder (Jordán & Casaretto, 2006).

Etileno es la única hormona vegetal gaseosa, simple y pequeña, presente en angiospermas y gimnospermas, aunque también está presente en musgos, hepáticas, helechos y otros organismos. Al ser un gas puede moverse rápidamente por los tejidos, no tanto por transporte sino por difusión, además su efecto se inicia con cantidades mínimas, lo cual le permite provocar respuestas al estrés de forma

casi inmediata (Jordán & Casaretto, 2006). Se ha encontrado que el que el gen ERF113 el cual pertenece a la familia ERF, posee una respuesta transcripcional para el etileno, el ácido jasmónico, el ácido salicílico y el ácido abisícico, en consecuencia, la sobre-expresión de ERF113 confiere resistencia a los estreses que activan estas hormonas. Por ejemplo, la sobre-expresión de ERF113 desencadena el cierre de estomas y mejora la tolerancia al encharcamiento (Krishnaswamy *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012; Heyman *et al.*, 2018).

Algunos autores proponen que los patrones en los datos de expresión de genes pueden ser explicados con perfiles de los elementos *cis* (Segal *et al.*, 2005; Appel *et al.*, 2014). Con este análisis *in silico* se logró caracterizar motivos *cis* en las regiones promotoras de distintos genes, donde se observó que todos los genes presentan motivos compartidos en las secuencias de *A. thaliana* y de *M. esculenta*. Algunos de estos elementos sirven como importantes componentes reguladores de las vías de señalización de hormonas que responden al ataque de insectos, varios de los elementos *cis* enriquecidos pertenecen a clases bien caracterizadas, que incluyen ABRE, G-Box, I-box, cajas TATA y cajas WRKY (Appel *et al.*, 2014).

8.2.2 Análisis de la expresión génica

Para la evaluación del PCR se utilizaron seis muestras de ARN correspondientes a cada uno de los tiempos estipulados para el análisis molecular con el ácaro verde (Tabla 3). Como control positivo, se amplificó ADNc con el primer G3PDH (Figura 21), esto con el fin de tener un gen de referencia para el análisis de los demás genes. Como control negativo simplemente se agregó agua en lugar de la muestra de ADNc.

En la figura 22 se observan muestras de ADNc que amplifican un fragmento del gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (ACO4) con un tamaño de amplificación de 430 pares de bases de acuerdo al primer diseñado (Tabla 1), en la figura se aprecia que el gen amplificó en todos los tiempos de evaluación (cero horas, 24

horas y cuatro días) y en los dos genotipos de la yuca (CMC-40 y ECU-72), sin embargo, se puede notar que en el genotipo resistente (ECU-72) las bandas lucen más gruesas y más nítidas. Por otra parte, el genotipo CMC-40 luce una banda en el tiempo cero horas, delgada en comparación con las demás bandas, que luego en el tiempo 24 horas y cuatro días, las bandas lucen un grosor ya característico del genotipo resistente. Esto puede indicar que el gen efectivamente se expresa en ambos genotipos, pero que en el caso de CMC-40, su expresión se demora más en alcanzar los niveles ideales como se refleja en los tiempos de evaluación. En el trabajo de Marín-Colorado (2015) se observa el mismo patrón en la regulación proteómica de 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa en el genotipo 60444 (Figura 23), con valores de 1.001179 en el tiempo seis horas, 1.10097 en el tiempo 24 horas, 1.083976 en el tiempo cuatro días y 1.186844 en el tiempo ocho días.

Tabla 3. Muestras de ARN utilizadas en el análisis molecular de la interacción planta-ácaro verde.

| Tiempo | Genotipo | |
|----------|------------|------------|
| | CMC-40 | ECU-72 |
| 0 horas | CA 0h 2.2 | EA 0h 1.1 |
| 24 horas | CA 24h 2.3 | EA 24h 2.1 |
| 4 días | CA 4d 3.2 | EA 4d 2.3 |

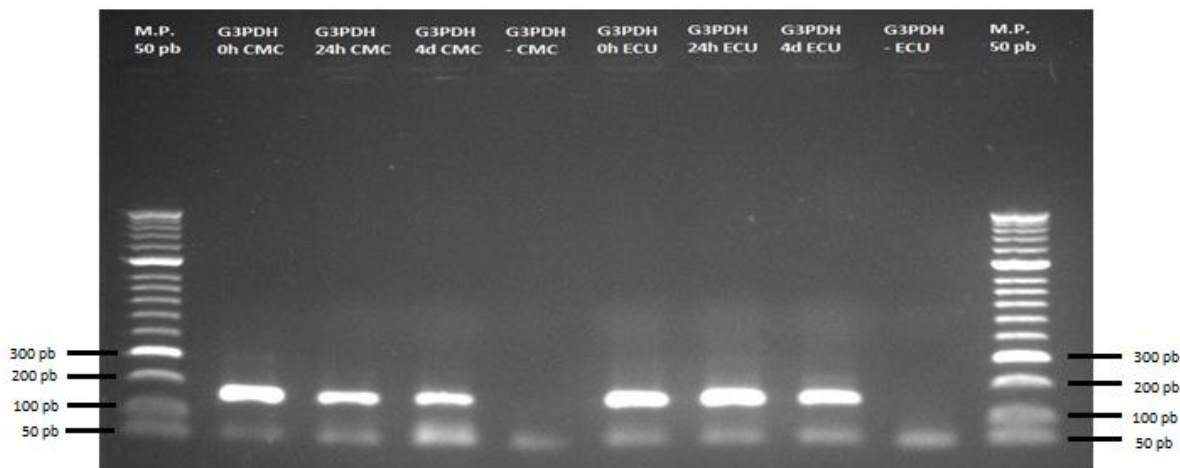


Figura 21. Muestras de ADNc amplificadas con el primer G3PDH, que amplifica un fragmento del gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

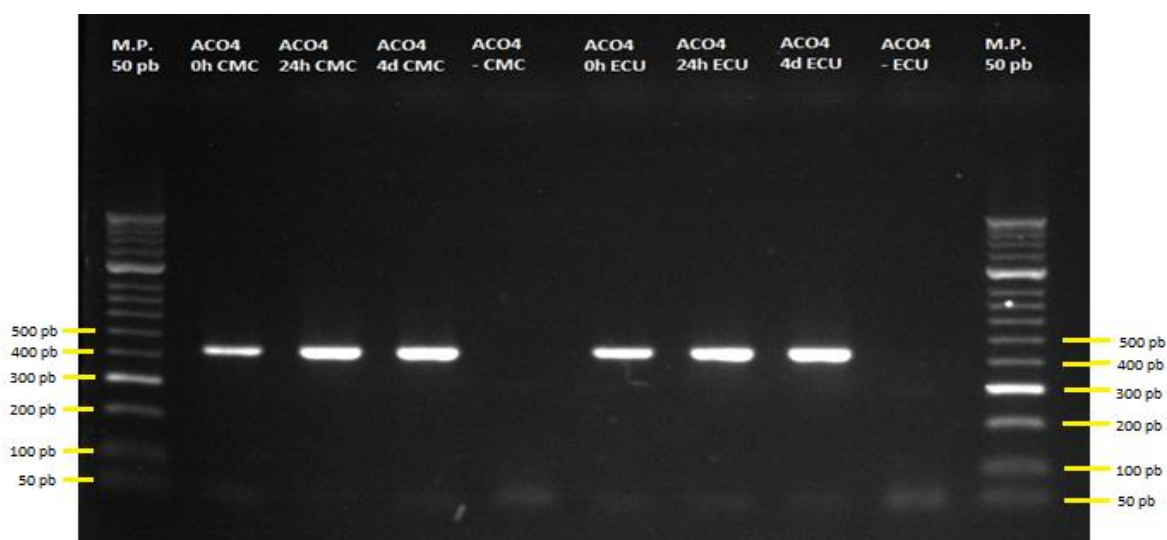


Figura 22. Muestras de ADNc amplificadas con el primer ACO4, que amplifica un fragmento del gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa.

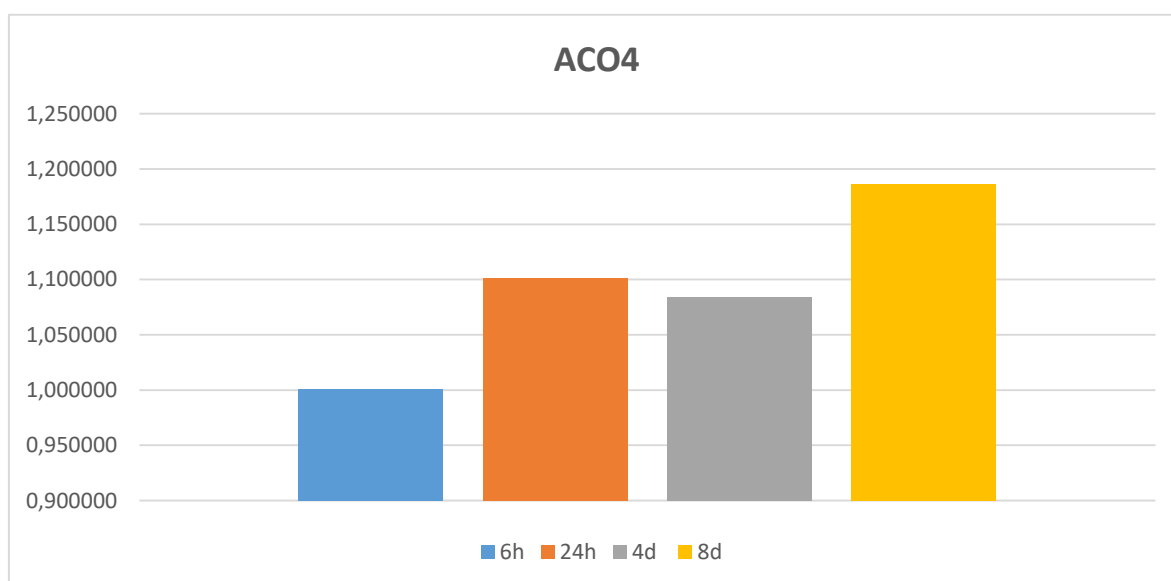


Figura 23. Proteína 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa bajo sobre-regulación identificada por Marín-Colorado (2015) mediante progénesis implicados en metabolismo de hormonas para el genotipo 60444. Los valores en los tiempos evaluados explican la regulación de las proteínas.

En la figura 24 se observan muestras de ADNc que amplifican un fragmento del gen

DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP (DBRH20) con un tamaño de amplificación de 590 pares de bases de acuerdo al primer diseñado (Tabla 1), se aprecia que el gen amplificó en todos los tiempos de evaluación y en los dos genotipos de la yuca, sin embargo, se vuelve a apreciar que en el genotipo ECU-72 las bandas lucen más gruesas y nítidas. El genotipo CMC-40 luce una banda en el tiempo cero horas, delgada y tenue, en el tiempo 24 horas luce una banda delgada en comparación con las demás bandas, luego en el tiempo cuatro días la banda luce de un grosor similar a las bandas del genotipo ECU-72. Sin embargo, los resultados de Marín-Colorado (2015) muestran un comportamiento diferente en la regulación proteómica de DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP en el genotipo 60444 (Figura 25), en el tiempo seis horas el valor fue 1.391367, en el tiempo 24 horas el valor fue 1.28162, en el tiempo cuatro días el valor fue 1.260104 y en el tiempo ocho días el valor fue 1.348629.

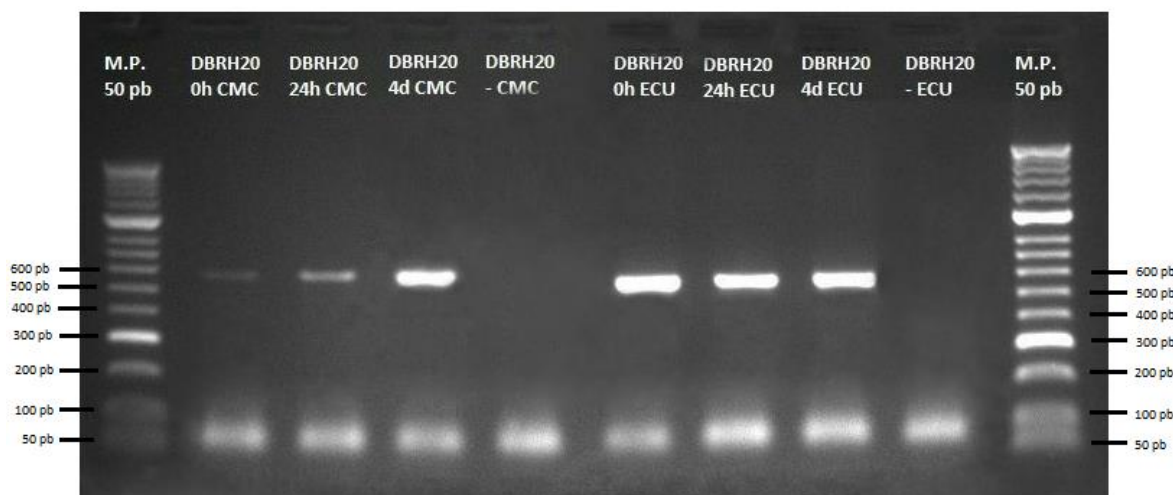


Figura 24. Muestras de ADNc amplificadas con el primer DBRH20, que amplifica un fragmento del gen DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP.

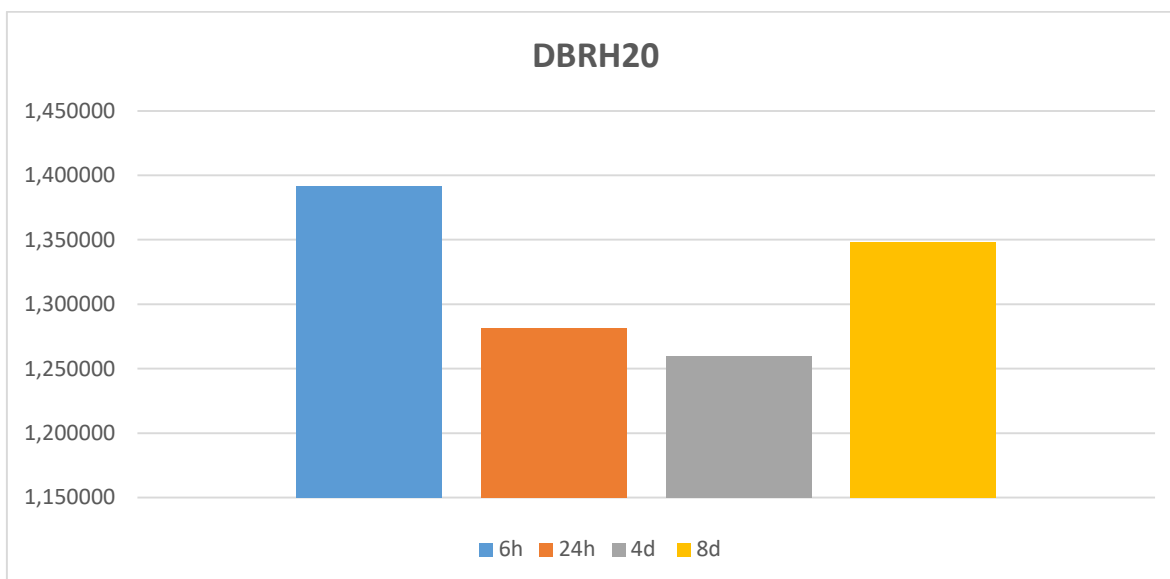


Figura 25. Proteína DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP bajo sobre-regulación identificada por Marín-Colorado (2015) mediante progénesis implicados en metabolismo de hormonas para el genotipo 60444. Los valores en los tiempos evaluados explican la regulación de las proteínas.

En la figura 26 se observan muestras de ADNc que amplifican un fragmento del gen Protoclorofilida reductasa A (PORA) con un tamaño de amplificación de 346 pares de bases de acuerdo al primer diseñado (Tabla 1), en la figura se aprecia que el gen amplificó en todos los tiempos de evaluación y en los dos genotipos de la yuca. Se vuelve a apreciar que en el genotipo ECU-72 las bandas lucen más gruesas. Sin embargo, en el genotipo CMC-40 el patrón en los tiempos de evaluación de la expresión génica cambia, luce una banda más gruesa en el tiempo cero, en el tiempo 24 horas luce una banda de tamaño intermedio, luego en el tiempo cuatro días la banda luce de un tamaño mucho más delgado. Esto se puede explicar porque el gen fue seleccionado a partir de unos microarreglos donde reportan al gen como reprimido (Figura 7), lo que se refleja en las bandas conforme avanzan los tiempos de evaluación (Kempema *et al.*, 2007).

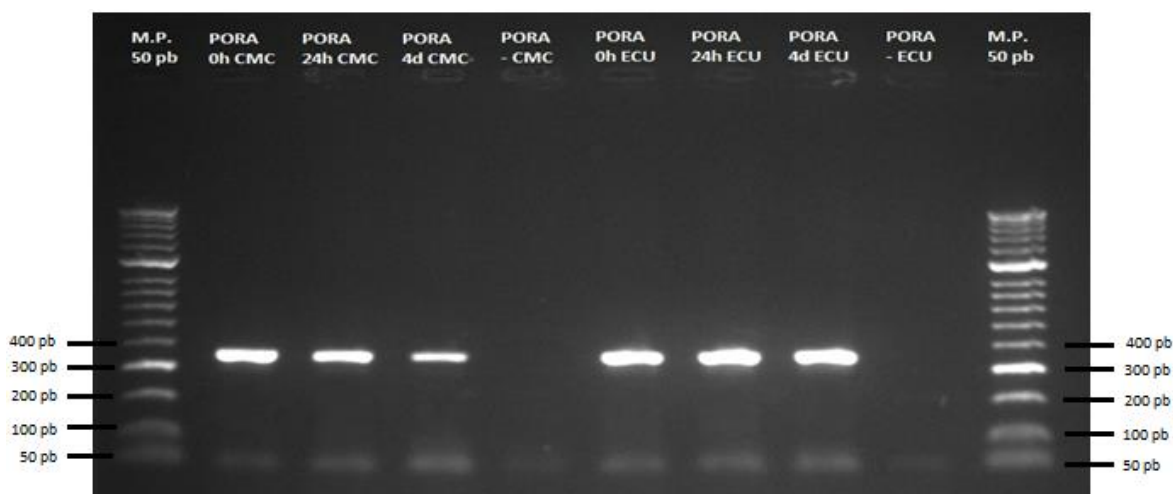


Figura 26. Muestras de ADNc amplificadas con el primer PORA, que amplifica un fragmento del gen Protoclorofilida reductasa A.

Se demostró una regulación positiva de los genes 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa, DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP y Protoclorofilida reductasa A bajo el estrés producido por el ataque del ácaro en los experimentos con los genotipos CMC-40 y ECU-72 de yuca. Los genes 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa y DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP mostraron una sobre-expresión a medida avanzaron los tiempos de evaluación, especialmente a los cuatros días de interacción con el ácaro verde. El gen Protoclorofilida reductasa A presentó baja expresión conforme avanzaron los tiempos de evaluación, evidenciando lo que podría ser un perfil génico reprimido, debido a que este gen ya se ha reportado con baja regulación en *Arabidopsis thaliana* bajo el ataque de *Bemisia tabaci* (Kempema *et al.*, 2007). Sin embargo, para confirmar esto es necesario hacer una evaluación más exhaustiva, con mayores tiempos de evaluación y con análisis cuantitativos como el qPCR en tiempo real (Mestdagh *et al.*, 2009).

El análisis de expresión mediante PCR es fundamental, ya que sirve como el primer paso en la detección de genes con potencial para el establecimiento de futuros genotipos resistentes a herbivoría u otros tipos de estrés (Hossain *et al.*, 2017). Por

ejemplo, el gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxiadasa (ACO4) ha sido ampliamente estudiado y algunos resultados (Xu *et al.*, 2008; Tsang *et al.*, 2011) indican que forma parte de un mecanismo de señalización que controla el alargamiento de las células de la raíz de forma independiente a la señalización del etileno. Así mismo, otros estudios han demostrado la inducción de la expresión génica de ACO4 por estrés biótico y abiótico, tratamientos con fitohormonas (incluida el etileno) y señales de desarrollo y ontológicas en otras especies de plantas (Dorling & McManus, 2012). Además, la expresión de ACO4 también puede verse afectada por mecanismos de regulación postranscripcionales y postraduccionales (Datta *et al.*, 2015; Nascimento *et al.*, 2018).

Por otro lado, la creciente evidencia sugiere que DEAD-box ARN helicasa desempeña un papel importante en los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, probablemente a través de la regulación del metabolismo del ARN y la expresión génica. Algunas investigaciones (Matthes *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2007) demostraron que plantas de *Arabidopsis* transgénicas que expresan el gen OsBIRH1, el cual codifica una proteína de DEAD-box ARN helicasa, poseen una mayor tolerancia al estrés oxidativo y a niveles elevados de expresión de genes de defensa oxidativa. Los resultados sugirieron que el gen OsBIRH1 juega un papel importante en las respuestas de defensa contra estreses bióticos y abióticos. Igualmente, se han identificado más de 50 miembros de DEAD-box ARN helicasa en *Arabidopsis* (Aubourg *et al.*, 1999, Boudet *et al.*, 2001) y a pesar de que se sabe de su participación en varios procesos biológicos, sus funciones precisas y su regulación aún no han sido dilucidadas (Li *et al.*, 2008).

9. CONCLUSIONES

Se comprobó la preferencia de oviposición del ácaro verde en el genotipo susceptible CMC-40 sobre el genotipo resistente ECU-72 en el experimento a libre escogencia. La prueba no fue concluyente con un nivel de significancia de 5 % en el experimento a no libre escogencia.

Se encontraron dos genes (PORA y ERF6) relacionados con el etileno por medio de uso del software Genevestigator. La expresión del gen PORA sintetiza la enzima Protoclorofilida reductasa A, enzima vegetal involucrada en la ruta de biosíntesis de la clorofila, la enzima PORA reduce uno de los dobles enlaces de la protoclorofilida usando NADPH y luz (Gabruk *et al.*, 2017), lo que se vio evidenciado con la presencia de una gran cantidad de motivos *cis* involucrados en la respuesta de la luz (G-box, ACE, Box 4, GA y TCT). Por otra parte, el gen ERF6 regula la expresión en respuesta al estrés por bajas concentraciones de manitol, que desencadena el crecimiento de las hojas de la planta (Dubois *et al.*, 2015).

Se corroboró la expresión de los genes 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (ACO4), DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP (DBRH20) y Protoclorofilida reductasa A (PORA), por medio de PCR convencional en los dos genotipos de *Manihot esculenta* evaluados, donde se observó que el genotipo ECU-72 presentó mayores niveles de sobre-expresión (bandas más gruesas y claras). En cuanto a las implicaciones fisiológicas el gen ACO4 codifica la oxidasa del ácido aminociclopropano carboxílico, enzima reguladora de la síntesis de etileno y precursor inmediato del etileno en la ruta biosintética de esta hormona en las plantas, también regula la maduración del fruto, un proceso sumamente complejo caracterizado por una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos coordinados que conducen al desarrollo de frutos suaves y comestibles (Mena-Violante *et al.*, 2009). El gen DBRH20 con frecuencia causa defectos morfológicos severos en los sistemas de las plantas, sin embargo, la expresión del gen ocurre preferentemente en el desarrollo de la fruta y se ve potenciada por la exposición al etileno, lo que

implica una asociación con la regulación de los genes requeridos para la respuesta celular a la hormona de la planta (Linder & Owttrim, 2009).

La caracterización estructural de promotores corrobora la relación del etileno con hormonas como el ácido salicílico, el ácido abscísico, jasmonatos, auxinas y giberelinas. Interacciones mutuas entre las hormonas específicas del estrés, tales como el ácido salicílico, el ácido jasmónico y el etileno son considerados como la columna vertebral de la inmunidad (Jones & Dangl, 2006). Sin embargo, hormonas estimulantes del crecimiento (auxinas, citoquininas, ácido giberélico, y el ácido abscísico) pueden inhibir o potenciar este equilibrio en la mediación de la protección o la susceptibilidad de la planta contra los patógenos invasores. Las auxinas ejercen procesos de desarrollo, tales como el mantenimiento de los meristemos radiculares, la formación de raíces laterales, la determinación de la posición de la hoja y la inducción de organogénesis (Cervantes-Flores, 2014).

En la caracterización de los genes 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa, DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP y Protoclorofilida reductasa A, se obtuvo resultados esperados en cuanto a motivos *cis* que comparten los tres genes, donde los motivos G-box, ARE y TC-rich repeats son los que más se presentaron en las diferentes regiones promotoras. El gen aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa fue el único que presentó un motivo *cis* involucrado en la respuesta del etileno (motivo ERE). Los motivos involucrados a la respuesta de la luz fueron los más observados (G-box, Box 4, L-Box, ACE, Sp1, GA, GAG y TCT).

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera M. 2012. La yuca en el Caribe colombiano: De cultivo ancestral a agroindustrial. BANCO DE LA REPÚBLICA-ECONOMÍA REGIONAL.
- Álvarez E, Bellotti AC, Calvert L, Arias B, Cadavid LF, Pineda B, Llano G, Cuervo M. 2002. Guía práctica para el manejo de enfermedades, las plagas y las deficiencias nutricionales de la yuca. Cali: CIAT/CLAYUCA.
- Appel HM, Fescemyer H, Ehlting J, Weston D, Rehrig E, Joshi T, Schultz J. 2014. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* to chewing and sucking insect herbivores. *Frontiers in Plant Science*, 5,565.
- Arias B, Guerrero J. 2000. Control de plagas de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) por resistencia varietal. Memorias XXVII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. SOCOLEN. Medellín - Colombia, Julio 26-28 de 2000. Pp. 243-259.
- Arimura G, Ozawa R, Nishioka T, Boland W, Koch T, Kühnemann F, Takabayashi J. 2002. Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring lima bean plants. *The Plant Journal*, 29(1), 87-98.
- Arimura G, Huber D, Bolhmann J. 2004. Forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*) induce local and systemic diurnal emissions of terpenoid volatiles in hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *deltanoides*): cDNA cloning, functional characterization, and patterns of gene expression of (-)-germacrene D synthase, *PtdTPS1*. *The Plant Journal*, 37, 603-616.
- Aristizábal J, Sánchez T. 2007. Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO 163.
- Aubourg S, Kreis M, Lecharny A. 1999. The DEAD box RNA helicase family in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* 27, 628–636.
- Austin RS, Hiu S, Waese J, Ierullo M, Pasha A, Wang TT, Moses A. 2016. New BAR tools for mining expression data and exploring Cis-elements in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 88(3), 490-504.

- Balogopalan C. 2002. Cassava utilization in food, feed and industry. In: Hillocks JM, Thresh JM, Bellotti AC (eds) Cassava: Biology, Production and Utilization. CABI Publishing, Oxon, UK, pp 301-318.
- Bellotti AC. 2000. Las plagas principales del cultivo de la yuca: un panorama global. Memorias XXVII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología SOCOLEN Medellin, Colombia, pp 189-217.
- Bellotti AC, 2008. Cassava pest and their management. Encyclopedia of Entomology. In: J.L. Capinera, Kluwer, Dordrecht.
- Bellotti AC, Herrera CL, Hernández M, Arias B, Guerrero JM, Melo EL. 2012. Cassava Pests in Latin America, Africa and Asia. In R. H. Howeler, ed. The Cassava Handbook –A reference manual based on the Asian regional cassava training course, held in Thailand. Cali, Colombia, CIAT. pp. 199-257.
- Bellotti AC, Herrera CJ, Melo EL, Arias B, Guerrero JM, Hernández M. 2006. Control de plagas en el cultivo de la yuca: Ácaros y Mosca Blanca. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, Cali, Colombia.
- Bellotti AC, Riis L. 1994. Cassava cyanogenic potential and resistance to pests and diseases. Acta Horticulturae. 375: 141-145.
- Bellotti AC, Smith L, Lapointe SL. 1999. Recent advances in cassava pest management. Annu. Rev. Entomol. 1999. 44:343–70.
- Bisset JA. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. Revista Cubana de Medicina Tropical, 54(3), 202-219.
- Bohórquez A. 2011. Aislamiento de secuencias expresadas diferencialmente durante la respuesta de defensa al ataque de la mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis*) en el cultivo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) mediante genómica funcional. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Colombia. Palmira-Colombia.
- Boller T. 1991. Ethylene in pathogenesis and disease resistance. The Plant Hormone Ethylene., 293-314.
- Boudet N, Aubourg S, Toffano-Nioche C, Kreis M, Lecharny A. 2001. Evolution of intron/exon structure of DEAD helicase family genes in *Arabidopsis*, *Caenorhabditis*, and *Drosophila*. Genome Research 11, 2101–2114.

- Braam J. 2005. In touch: Plant responses to mechanical stimuli. *New Phytologist* 165: 373–389.
- Brentassi ME, de Remes Lenicov M. 2015. Oviposición de *Delphacodes kuscheli* (Homoptera-Delphacidae) sobre plantas de cebada en condiciones de laboratorio. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*, 104(1), 67-74.
- Broekaert WF, Delaure SL, De Bolle MF, Cammue BP. 2006. The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 44: 393–416.
- Burbano M, Carabalí A, Montoya J, Bellotti AC. 2007. Resistencia de especies de *Manihot* a *Mononychellus tanajoa* (Acariformes), *Aleurotrachelus socialis* y *Phenacoccus herreni* (Hemiptera). *Revista Colombiana de Entomología*, 33(2), 110-115.
- Byrne DH, Bellotti AC, Guerrero JM. 1983. The cassava mites. *International Journal of Pest Management*, 29(4), 378-394.
- Carrillo R, Pérez H, Neira M. 2002. Comportamiento de oviposición de *Aegorhinus superciliosus* (Guerin) (Coleoptera: Curculionidae). *Agro sur*, 30(1), 47-50.
- Ceballos H, Fregene M, Lentini Z, Puentes J, Pérez J, Rosero A, Tofiño A. 2006. Development and identification of high-value cassava clones. *Acta Hortícola* 703: 63-70.
- Ceballos H, Iglesias CA, Pérez JC, Dixon A. 2004. Cassava breeding: opportunities and challenges. *Plant Molecular Biology* 56: 503–516.
- Cervantes Flores F. 2014. Evaluación de efectos de resistencia-susceptibilidad a plagas y enfermedades, productividad y calidad frente a la aplicación de citoquininas y auxinas en plantas de rosa (*Rosa* sp.) (Bachelor's thesis, Quito).
- CIAT. 2002. La yuca en Colombia y el mundo: nuevas perspectivas para un cultivo milenario. La yuca en el tercer milenio. Publicación CIAT. Cali, Colombia.
- CIAT. 2006. Manejo integrado de moscas blancas asociadas al cultivo de la yuca. Proyecto Manejo Integrado Sostenible de Moscas Blancas Como Plagas y Vectores de Virus en los Trópicos. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.

- Cohn JR, Martin GB. 2005. *Pseudomonas syringae* pv. tomato type III effectors AvrPto and AvrPtoB promote ethylene-dependent cell death in tomato. *Plant J.* 44:139–54
- Contreras E, López CE. 2008. Expresión de dos genes candidatos a resistencia contra la bacteriosis vascular en yuca. *Acta Biológica Colombiana.*, 2, 175-188.
- Costa EC, Teodoro AV, Rego AS, Maciel AG, Sarmiento RA. 2012. Population structure and dynamics of the cassava green mite *Mononychellus tanajoa* (Bondar) and the predator *Euseius ho* (DeLeon) (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae). *Arthropods*, 1(2), 55.
- Datta R, Kumar D, Sultana A, Hazra S, Bhattacharyya D, Chattopadhyay S. 2015. Glutathione regulates 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase transcription via WRKY33 and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by modulating messenger RNA stability to induce ethylene synthesis during stress. *Plant Physiol.* 169, 2963–2981.
- Delessert C, Wilson I, Van Der Straeten D, Dennis E, Dolferus R. 2004. Spatial and temporal analysis of the local response to wounding. *Plant molecular biology*, 55(2), 165-181.
- De Moraes CM, Mescher MC, Tumlinson JH. 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature*, Vol 410.
- Devine GJ, Eza D, Ogusuku E, Furlong MJ. 2008. Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista peruana de medicina experimental y Salud Pública*, 25(1), 74-100.
- Dorling SJ, McManus MT. 2012. “The fate of ACC in higher plants,” in *Annual Plant Reviews*, Vol. 44. eds B. A. Ambrose, and M. Purugganan (Oxford: Wiley-Blackwell), 83–115.
- Dubois M, Van den Broeck L, Claeys H, Van Vlierberghe K, Matsui M, Inzé D. 2015. The ETHYLENE RESPONSE FACTORS ERF6 and ERF11 antagonistically regulate mannitol-induced growth inhibition in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, pp-00335.

- Eke-Okoro ON, Njoku DN, Madu A, Ezulike TO. 2009. Impact of global warming and crop factors on the growth and productivity of four cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars in Nigeria. Scientific Research and Essay Vol.4 (10), pp. 955-960.
- FAO. 2006. Datos agrícolas de FAOSTAT. Producción. Cultivos primarios. En Base de datos estadísticos de la FAO.
- FAO. 2012. Food outlook. Global market analysis – November 2012. Rome.
- FAO. 2014. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. FAOSTAT Statistical Databases.
- Faria M, Wraight S. 2001. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. Crop Protection 20 (9): 767-778. Farmer, E.E. 2001. Surface-to-air signals. Nature 411(6839): 854-856.
- Franco D, Domínguez J, de Castro MDP, Aránega A. 2002. Regulación de la expresión génica en el miocardio durante el desarrollo cardíaco. Revista Española de Cardiología, 55(2), 167-184.
- Gleadow RM, Evans JR, McCaffery S, Cavagnaro TR. 2009. Growth and nutritive value of cassava (*Manihot esculenta* Cranz.) are reduced when grown in elevated CO₂. Plant Biology, 11(s1), 76-82.
- Harfouche AL, Shivaji R, Stocker R, Williams PW, Luthe DS. 2006. Ethylene signaling mediates a maize defense response to insect herbivory. Molecular plant-microbe interactions, 19(2), 189-199.
- Haswell ES, Peyronnet R, Barbier-Brygoo H, Meyerowitz EM, Frachisse JM. 2008. Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the *Arabidopsis* root. Current Biology 18: 730–734.
- Hernandez-Garcia CM, Finer JJ. 2014. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. Plant Science, 217, 109-119.
- Herrera B. 2009. Predicción de distribución potencial de plagas de yuca, utilizando modelos de nicho ecológico. Universidad del Valle, Departamento de Geografía. Decisión y análisis de políticas – CIAT.

- Heyman J, Canher B, Bisht A, Christiaens F, De Veylder L. 2018. Emerging role of the plant ERF transcription factors in coordinating wound defense responses and repair. *J Cell Sci*, jcs-208215.
- Hilker M, Meiners T. 2006. Early herbivore alert: insect eggs induce plant defense. *Journal of chemical ecology*, 32(7), 1379-1397.
- Hillocks JM. 2002. Cassava in Africa. In: Hillocks JM, Thresh JM, Bellotti AC (eds) *Cassava: Biology, Production and Utilization*. CABI Publishing, Oxon, UK, pp 209-235.
- Himani S, Sonia S, Sneha N, Rekha M, Indu S, Ravish C. 2014. Computational analysis of cis-acting regulatory elements in 5' regulatory regions of sucrose transporter gene families in wheat and *Arabidopsis*. *Research Journal of Biotechnology* Vol, 9, 4.
- Hossain MM, Imran S, Islam MA, Abdul M. 2017. Expressional analysis of OsNHX1, OsNHX2, OsSOS1 and Os DREB transporters in salt tolerant (FR13A) and salt sensitive rice (brri dhan29) induced by salinity stress. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*. Volume 10, pp 64-70
- Ibraheem O, Botha CE, Bradley G. 2010. In silico analysis of cis-acting regulatory elements in 5' regulatory regions of sucrose transporter gene families in rice (*Oryza sativa* Japonica) and *Arabidopsis thaliana*. *Computational biology and chemistry*, 34(5-6), 268-283.
- Inbar M, Gerling D. 2008. Plant-mediated interactions between whiteflies, herbivores, and natural enemies. *Annual Review of Entomology* 53: 431-448
- Jansson C, Westerbergh A, Zhang J, Hu X, Sun C. 2009. Cassava, a potential biofuel crop in (the) People's Republic of China. *Applied Energy* 86, Supplement 1: S95-S99.
- Jones JD, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323.
- Jordán M, Casaretto J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico. *Fisiología vegetal*. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

- Kawai Y, Ono E, Mizutani M. 2014. Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *The Plant Journal*, 78(2), 328-343.
- Kempema LA, Cui X, Holzer FM, Walling LL. 2007. *Arabidopsis* transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. *Plant Physiology*, 143(2), 849-865.
- Kobayashi K, Otegui MS, Krishnakumar S, Mindrinos M, Zambryski P. 2007. INCREASED SIZE EXCLUSION LIMIT 2 encodes a putative DEVH box RNA helicase involved in plasmodesmata function during *Arabidopsis* embryogenesis. *The Plant Cell* 19, 1885–1897.
- Krishnaswamy S, Verma S, Rahman MH, Kav NNV. 2011. Functional characterization of four APETALA2-family genes (RAP2.6, RAP2.6L, DREB19 and DREB26) in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 75, 107-127.
- Latchman DS. 1997. Transcription factors: an overview. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 29(12), 1305-1312.
- Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rombauts S. 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research*, 30(1), 325-327.
- Li D, Liu H, Zhang H, Wang X, Song F. 2008. OsBIRH1, a DEAD-box RNA helicase with functions in modulating defence responses against pathogen infection and oxidative stress. *Journal of experimental botany*, 59(8), 2133-2146.
- Linder P, Owttrim GW. 2009. Plant RNA helicases: linking aberrant and silencing RNA. *Trends in plant science*, 14(6), 344-352.
- Liu P, Sun F, Gao R, Dong H. 2012. RAP2.6L overexpression delays waterlogging induced premature senescence by increasing stomatal closure more than antioxidant enzyme activity. *Plant Mol. Biol.* 79, 609-622.
- López RA, Carmona D, Trumper E, Huarte M. 2015. Comportamiento de la actividad alimentaria y de oviposición de *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) (Diptera: Agromyzidae), en variedades de *Solanum tuberosum* L. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 19(1), 1-17.

- Louder RK, He Y, López-Blanco JR, Fang J, Chacón P, Nogales E. 2016. Structure of promoter-bound TFIID and model of human pre-initiation complex assembly. *Nature*, 531(7596), 604.
- Mann C. 1997. Reseeding the green revolution (vol 277, pg 1038, 1997). *Science* 277: 1593-1593.
- Marín-Colorado JA. 2015. Caracterización Molecular de la Resistencia en Yuca (*Manihot esculenta* Crantz) al ataque del ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*): una aproximación proteómica. Tesis de doctorado. Universidad del Valle - Univalle.
- Márquez JM. 2011. El manejo integrado de plagas. El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala. (Melgar M, Meneses A, Orozco H, Pérez O, Espinosa R. Eds). CENGICANA, Guatemala, 204-231.
- Martínez G, Soler R, Dicke M. 2013a. Behavioral Ecology of Oviposition-Site Selection in Herbivorous True Bugs. In: *Advances in the Study of Behavior*, Elsevier 45: 175-207.
- Martínez G, González A, Soler R, Dicke M. 2013b. ¿Cómo es afectada la selección de sitios de alimentación y oviposición en *Thaumastocoris peregrinus* por la presencia de conespecíficos? Resultados. Editores: Gustavo Balmelli.
- Matthes A, Schmidt S, Kohler D, Forner J, Wildum S, Raabe M, Urlaub H, Binder S. 2007. Two DEAD-box proteins may be part of RNA-dependent high-molecular-mass protein complexes in *Arabidopsis* mitochondria. *Plant physiology*, 145(4), 1637-1646.
- Maruthi MN, Hillocks RJ, Mtunda K, Raya MD, Muhanna M, Kiozia H, Thresh JM. 2005. Transmission of Cassava brown streak virus by *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Journal of Phytopathology*, 153(5), 307-312.
- Mena-Violante HG, Cruz-Hernández A, Paredes-López O, Gómez-Lim MÁ, Olalde-Portugal V. 2009. Fruit texture related changes and enhanced shelf-life through tomato root inoculation with *Bacillus subtilis* BEB-13BS. *Agrociencia*, 43(6).
- Mendonça RS, Navia D, Diniz IR, Flechtmann C. 2011. South American spider mites: New hosts and localities. *Journal of Insect Science* 11.

- Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. 2009. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome biology*, 10(6), R64.
- Mutisya DL, Molo R, El-Banhawy EM, Miano D, Kariuki CW, Owiti A, Aool W. 2016. Phylogenetic diversity of cassava green mite, *Mononychellus progresivus* from different geographical sites in east Africa. *African Crop Science Journal*, 24(1), 63-71.
- Nakagawa Y, Katagiri T, Shinozaki K, Qi Z, Tatsumi H, Furuichi T, Kishigami A, Sokabe M, Kojima I, Sato S, Kato T, Tabata S, Iida K, Terashima A, Nakano M, Ikeda M, Yamanaka T, Iida H. 2007. *Arabidopsis* plasma membrane protein crucial for Ca²⁺ influx and touch sensing in roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 104: 3639–3644.
- Nascimento FX, Rossi MJ, Glick BR. 2018. Ethylene and 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) in plant–bacterial interactions. *Frontiers in Plant Science*, 9, 114.
- Nhassico D, Muquingue H, Cliff J, Cumbana A, Bradbury JH. 2008. Rising African cassava production, diseases due to high cyanide intake and control measures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 2043-2049.
- Olsen KM, Schaal BA. 2001. Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: further evidence for a southern Amazonian origin of domestication. *American journal of botany*, 88(1), 131-142.
- Ouaked F, Rozhon W, Lecourieux D, Hirt H. 2003. A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *The EMBO Journal* 22: 1282-1288.
- Overmyer K, Tuomainen H, Kettunen R, Betz C, Langebartels C, Sandermann H, Kangasjarvi J. 2000. Ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate-signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell*, 12, 1849–1862.
- Pallangyo B, Hanna R, Toko M, Gnanvossou D, Mgoo V, Otema M, Mfugale O. 2007. Biological control of cassava green mite in Tanzania. In *Proceedings of the 9th ISTRC-AB Symposium* (pp. 597-605), 1-5 November, Mombasa, Kenya.

- Panda N, Khush G. 1995. Host plant resistance to insects. International Rice Research Institute, Philippines. pp 431.
- Pastrana FE, Heraldo A, Salcedo JG. 2015. Respuesta de dos cultivares de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) (CM 3306-4 y MCOL 2215) a la aplicación de riego en condiciones hídricas diferentes. Acta Agronómica, 64(1), 48-53.
- Penninckx IA, Thomma BP, Buchala A, Métraux JP, Broekaert WF. 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 10(12), 2103-2113.
- Peramuna A, Bae H, Rasmussen EK, Dueholm B, Waibel T, Critchley JH, Simonsen HT. 2018. Evaluation of synthetic promoters in *Physcomitrella patens*. Biochemical and biophysical research communications, 500(2), 418-422.
- Pérez I. 2006. Manejo integrado de plagas. Horticultura internacional, (51), 66-67.
- Rangel G, Castro E, Beltran E, Reyes H, García E. 2010. El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 12(2), 90-95.
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez R, Moorman A, 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neurosci. Lett. 339, 62–66.
- Rao MV, Lee HI, Davis KR. 2002. Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. The Plant Journal, 32(4), 447-456.
- Rehrig E, Appel HM, Schultz JC. 2011. Measuring 'normalcy' in plant gene expression after herbivore attack. Molecular ecology resources, 11(2), 294-304.
- Rocak S, Linder P. 2004. DEAD-box proteins: the driving force behind RNA metabolism. Nature Reviews Molecular Cell Biology 5, 232–241.
- Rogers D, Appan S. 1973. *Manihot* and *Manihotoides* (Euphorbiaceae): A computer Assisted Study (Hafner, New York).
- Savatin DV, Gramegna G, Modesti V, Cervon F. 2014. Wounding in the plant tissue: the defense of a dangerous passage. Frontiers in plant science, 5, 470.

- Schmelz EA, Carroll MJ, LeClere S, Phipps SM, Meredith J, Chourey PS, Alborn HT, Teal P. 2006. Fragments of ATP synthase mediate plant perception of insect attack. PNAS, 8894–8899, vol. 103, no. 23.
- Segal E, Friedman N, Kaminski N, Regev A, Koller D. 2005. From signatures to models: understanding cancer using microarrays. Nat. Genet. 37(Suppl.) S38–S45.
- Strucker A, da Silva Bandeira HF, Silva AC, Arcanjo JM, Trassato LB. 2017. Preferência alimentar e de oviposição do ácaro-verde (Acari: Tetranychidae) em diferentes genótipos de mandioca em Roraima. REVISTA AGRO@MBIENTE ON-LINE, 11(3), 248-257.
- Suárez L, Mederos V. 2011. Apuntes sobre el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tendencias actuales. Cultivos Tropicales, 32(3), 27-35.
- Tang B, Chen X, Liu Y, Tian H, Liu J, Hu J, Zhang W. 2008. Characterization and expression patterns of a membrane-bound trehalase from *Spodoptera exigua*. BMC Molecular Biology, 9(1), 51.
- Tsang DL, Edmond C, Harrington JL, Nühse TS. 2011. Cell wall integrity controls root elongation via a general 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-dependent, ethylene-independent pathway. Plant Physiol. 156, 596–604.
- Vásquez-Ordóñez AA, Parsa S. 2014. A geographic distribution database of *Mononychellus* mites (Acari, Tetranychidae) on cassava (*Manihot esculenta*). ZooKeys 407: 1–8.
- Vashisht AA, Tuteja N. 2006. Stress responsive DEAD-box helicases: a new pathway to engineer plant stress tolerance. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 84(2), 150-160.
- Wang X, Chang L, Tong Z, Wang D, Yin Q, Wang D, Jin X, Yang Q, Wang L, Sun Y, Huang Q, Guo A, Huang Q. 2016. Proteomics profiling reveals carbohydrate metabolic enzymes and 14-3-3 proteins play important roles for starch accumulation during cassava root tuberization. Scientific reports, 6.
- Wellburn FAM & Wellburn AR. 1996. Variable patterns of antioxidant protection but similar ethene emission differences in several ozone-sensitive and ozone-tolerant plant selections. Plant Cell Environ. 19, 754–760.

- Wu CT, Bradford KJ. 2003. Class I chitinase and β -1,3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves. *Plant Physiol.* 133:263-273.
- Xu SL, Rahman A, Baskin TI, Kieber JJ. 2008. Two leucine-rich repeat receptor kinases mediate signaling, linking cell wall biosynthesis and ACC synthase in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 3065–3079.
- Yaninek JS. 1988. Continental dispersal of the cassava green mite, an exotic pest in Africa, and implications for biological control. *Experimental & applied acarology*, 4(3), 211-224.
- Yonow T, Kriticos DJ. 2014. *Mononychellus tanajoa*. HarvestChoice Pest Geography. St. Paul, MN: InSTePP-HarvestChoice.
- Zimmermann P, Hennig L, Gruissem W. 2005. Gene-expression analysis and network discovery using Genevestigator. *Trends in plant science*, 10(9), 407-409.
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W. 2004. GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant physiology*, 136(1), 2621-2632.
- Zou C, Sun K, Mackaluso JD, Seddon AE, Jin R, Thomashow MF, Shiu SH. 2011. Cis-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(36), 14992-14997.

CAPÍTULO 2: ARTÍCULO CIENTÍFICO

Revista Orinoquía

Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana

ISSN: 0121-3709 (impresa)

ISSN(E): 2011-2629

Evaluación en yuca (*Manihot esculenta* Crantz) de genes involucrados en la ruta metabólica del etileno frente al estrés ocasionado por *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae)

Evaluation in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) of genes involved in the metabolic pathway of ethylene against stress caused by *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae)

Avaliação em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de genes envolvidos na via metabólica do etileno contra o estresse causado por *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae)

Juan C Sánchez-Morales^{1*}; Jaime A Marín-Colorado², MSc. PhD.

¹ Estudiante de Biología, Facultad de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad de los Llanos

² Biólogo, MSc, PhD, Centro de Recursos Genéticos, Facultad de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad de los Llanos Llanos, Villavicencio, Colombia.

RESUMEN

La yuca (*Manihot esculenta*) es uno de los principales cultivos de la región tropical debido a su alto contenido de carbohidratos en forma de almidón. No obstante, se ve afectada por el ataque de artrópodos plaga como el ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*), el cual provoca grandes pérdidas en el rendimiento y en la producción de la yuca. Una forma de defensa natural en las plantas se ve reflejada en la expresión

* camilosanchez_03@hotmail.com

de genes, los cuales activan una serie de cascadas de señalización para hacer frente al estrés ocasionado por la interacción del ácaro con la planta. El etileno es una fitohormona gaseosa que regula el crecimiento y desarrollo de las plantas, está involucrada en la muerte celular como respuesta a factores de estrés biótico y abiótico, y también modula la muerte celular inducida por patógenos de plantas, exposición al ozono, y órgano-senescencia. Se evaluó la oviposición del ácaro verde sobre dos genotipos de yuca (CMC-40 y ECU-72). El análisis de expresión de genes es una herramienta ideal para comprender el comportamiento de los genes frente al estrés ocasionado por artrópodos plaga. Se evaluó la expresión de tres genes relacionados con el etileno (1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa, DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP y Protoclorofilida reductasa A) en los genotipos vegetales ECU-72 y CMC-40. Se caracterizó las regiones promotoras de los genes 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa, DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP y Protoclorofilida reductasa A. Con la evaluación de los genotipos de yuca en este estudio se confirmó como genotipo susceptible CMC-40 y como genotipo resistente ECU-72.

Palabras clave: *ácaro verde, etileno, expresión de genes, genotipos.*

ABSTRACT

The cassava (*Manihot esculenta*) is one of the main crops of the tropical region due to its high content of carbohydrates in the form of starch. However, it is affected by the attack of plague arthropods such as the green mite (*Mononychellus tanajoa*), which causes large losses in the yield and production of cassava. A form of natural defense in plants is reflected in the expression of genes, which activate a series of signaling cascades to cope with the stress caused by the interaction of the mite with the plant. Ethylene is a gaseous phytohormone that regulates the growth and development of plants, is involved in cell death in response to biotic and abiotic stress factors, and also modulates cell death induced by plant pathogens, ozone exposure, and organ-senescence. The oviposition of the green mite was evaluated

on two cassava genotypes (CMC-40 and ECU-72). The analysis of gene expression is an ideal tool to understand the behavior of genes against stress caused by pest arthropods. The expression of three genes related to ethylene (1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 20 and Protochlorophyllide oxidoreductase A) was evaluated in the plant genotypes ECU-72 and CMC-40. The promoter regions of the genes 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 20 and Protochlorophyllide oxidoreductase A were characterized. With the evaluation of cassava genotypes in this study was confirmed as susceptible genotype CMC- 40 and as a resistant genotype ECU-72.

Key words: *ethylene, gene expression, genotypes, green mite.*

RESUMO

Mandioca (*Manihot esculenta*) é uma das principais culturas em regiões tropicais, devido ao seu elevado teor de hidratos de carbono como o amido. No entanto, é afectada pelo ataque de pragas de artrópodes, tais como ácaros verde (*Mononychellus tanajoa*), o que provoca grandes perdas no rendimento e produção de mandioca. Uma forma de defesa natural em plantas está reflectida na expressão de genes, que activam uma série de cascatas de sinalização de lidar com o stress provocado pela interacção com o ácaro planta. O etileno é uma fito-hormona gasosa que regula o crescimento e desenvolvimento de plantas, está envolvida na morte celular em resposta a bióticos e abióticos tensões, e também modula por patogénios de plantas, a exposição a morte celular induzida por ozono e órgão-senescência. A oviposição do ácaro verde foi avaliada em dois génotipos de mandioca (CMC-40 e ECU-72) foi avaliada. A análise da expressão gênica é uma ferramenta ideal para entender o comportamento de genes contra o estresse causado por artrópodes-praga. Foi avaliada a expressão de três genes relacionados com etileno (oxidase 1-aminociclopropano-1-carboxilato de metilo, DEAD-box de ARN dependente de ATP-helicase e 20 protochlorophyllide redutase A) em génotipos-ECU planta e 72 CMC-

40. as regiões promotoras do carboxilato de 1-aminociclopropano-oxidase-1, DEAD-box de ARN dependente de ATP-helicase e 20 protochlorophyllide reductase A. A avaliação de genótipos de mandioca neste estudo foi caracterizado genes foi confirmada como genótipo susceptível CMC- 40 e como genótipo resistente ECU-72.

Palavras chave: *ácaro verde, etileno, expressão génica, genótipos.*

INTRODUCCIÓN

Las plantas se han visto obligadas a desarrollar diferentes estrategias debido a su estilo de vida inmóvil para contrarrestar los distintos tipos de estrés (biótico y abiótico), así como a las lesiones causadas por heridas (Heyman *et al.*, 2018). Cuando esto ocurre, las plantas responden a las heridas mediante la activación de sus sistemas de defensa (Savatin *et al.*, 2014), lo que conlleva a la iniciación de una cascada de señalización. Esto sucede mediante la inducción de proteínas relacionadas con la defensa y la activación de hormonas como el etileno y el ácido jasmónico que están relacionadas con heridas, así como de genes para respuestas generales de estrés (estrés oxidativo, estrés por deshidratación, proteínas de choque térmico, etc.) (Delessert *et al* 2004; Savatin *et al.*, 2014).

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un arbusto perenne leñoso de la familia Euphorbiaceae originario de Sudamérica (Olsen & Schaal, 2001; Aguilera, 2012), la yuca es un cultivo con una gran plasticidad, lo que le permite adaptarse a diferentes tipos de suelos y condiciones climáticas tropicales, crece en los trópicos húmedos y cálidos de tierras bajas, de mediana altitud, y en los subtrópicos con inviernos fríos y lluvias en verano, además, es resistente a las fuertes sequías (Aguilera, 2012; Pastrana *et al.*, 2015). El valor económico de la yuca es amplio, a partir de sus raíces como fuente de carbohidratos, los cultivos se pueden dirigir a cuatro mercados fundamentalmente: el consumo humano, la industria alimenticia, la industria de alimentos para animales y la industria no alimenticia (Suárez & Mederos, 2011). La

producción mundial de yuca en el año 2006 fue alrededor de 203 millones de toneladas, de las cuales Colombia aportó 2,1 millones de toneladas (FAO, 2006). En el 2008 alcanzó una producción mundial de casi 280 millones de toneladas (FAO, 2012). En Latinoamérica, la producción ha dado un impulso a la industria de la yuca, especialmente en Brasil, Paraguay y Colombia, donde los productores colombianos destinan las raíces de yuca al consumo humano, al uso industrial y en menor medida para la alimentación animal (Pastrana *et al.*, 2015). A pesar de que la yuca tiene una gran producción, esta se ve afectada por alrededor de 200 especies de artrópodos plaga asociadas al cultivo, entre las que se destaca el ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*) (Bellotti *et al.*, 2012).

El ácaro verde (*M. tanajoa*) pertenece a la familia Tetranychidae, es originario de Sudamérica y es conocido por ser una importante plaga para los cultivos de yuca (Yonow & Kriticos, 2014), se considera que ha coevolucionado con el cultivo, al punto de adaptarse a las barreras físicas y químicas como lo son los compuestos laticíferos y cianogénicos, claves en la defensa bioquímica natural de la planta (Bellotti & Riis, 1994; Marín-Colorado, 2015). El grado de daño ocasionado por este artrópodo en cultivos de yuca, varía de acuerdo a las condiciones ambientales, la fertilidad del suelo, la edad de la planta y la prolongación del ataque (Bellotti, 2000; Marín-Colorado, 2015).

Los agricultores a menudo utilizan plaguicidas para evitar la infestación de artrópodos plagas en los cultivos (CIAT, 2006), la aplicación continua de agentes tóxicos conlleva a que el ácaro genere tolerancia al producto químico, por lo que al final la plaga resulta siendo más resistente (Faria & Wraight, 2001). Además de que incrementa significativamente los niveles de contaminación ambiental (Panda & Khush, 1995), también genera graves impactos en la salud pública (Arias & Guerrero, 2000). Por tal motivo siempre es recomendado tener un riguroso control biológico que permita un manejo integrado de plagas apropiado para mejorar la resistencia del hospedero y así mejorar la producción de yuca (Marín-Colorado, 2015).

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación fenotípica

Para la evaluación del ataque del ácaro verde a la yuca, se diseñaron ensayos a libre y no libre escogencia en donde se evaluaron la oviposición del ácaro sobre los dos genotipos de yuca seleccionados, tanto para el ensayo a libre y no libre escogencia se realizaron dos observaciones (9AM y 3PM) diarias durante cinco días. El experimento se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de los Llanos, siguiendo la metodología de evaluación de los lóbulos de cada genotipo en cajas de Petri (Marín-Colorado, 2015).

Material biológico

Se utilizaron dos genotipos de yuca, CMC-40 y ECU-72, los cuales presentan respuestas contrastantes frente al ataque ácaro verde, susceptible y resistente, respectivamente. Se propagaron en cultivo *in vitro* en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de los Llanos alrededor de 30 plántulas bajo condiciones de temperatura (25 ± 2 °C), humedad relativa (70 ± 5 %) y fotoperiodo (12 horas) controladas durante tres meses, también se utilizaron 30 estacas de cada genotipo que fueron sembradas en bolsas con tierra abonada y posteriormente trasplantadas en campo. Las plantas del cultivo *in vitro* al igual que las estacas fueron sembradas en bolsas con tierra abonada, y solo las estacas fueron utilizadas en la infestación con el ácaro verde donde se evaluó su resistencia y susceptibilidad.

Colecta del ácaro verde

La colecta de individuos de ácaro verde se realizó mediante la recolección de hojas de yuca que tuvieran la presencia del ácaro verde, una vez colectada un gran número de hojas, se llevaron al laboratorio para infestar plantas de yuca preparadas para la cría del ácaro verde. La ubicación de colecta fue en el municipio de San Luís de Cubarral (03° 47' 22,2", 73° 50' 37,9").

Ensayo a libre escogencia

Los ensayos se realizaron en cajas de Petri (150 mm x 15 mm) con una espuma humedecida con agua para prolongar la vida de los lóbulos utilizados, estos se distribuyeron de a cinco lóbulos de CMC-40 y cinco lóbulos de ECU-72 de forma intercalada para un total de diez lóbulos, en el medio se pusieron ácaros verdes para realizar la evaluación a libre escogencia de la oviposición de los mismos (Figura 1a), se utilizaron en total seis cajas de Petri para un total de 30 repeticiones de lóbulos por genotipo (Figura 1b).

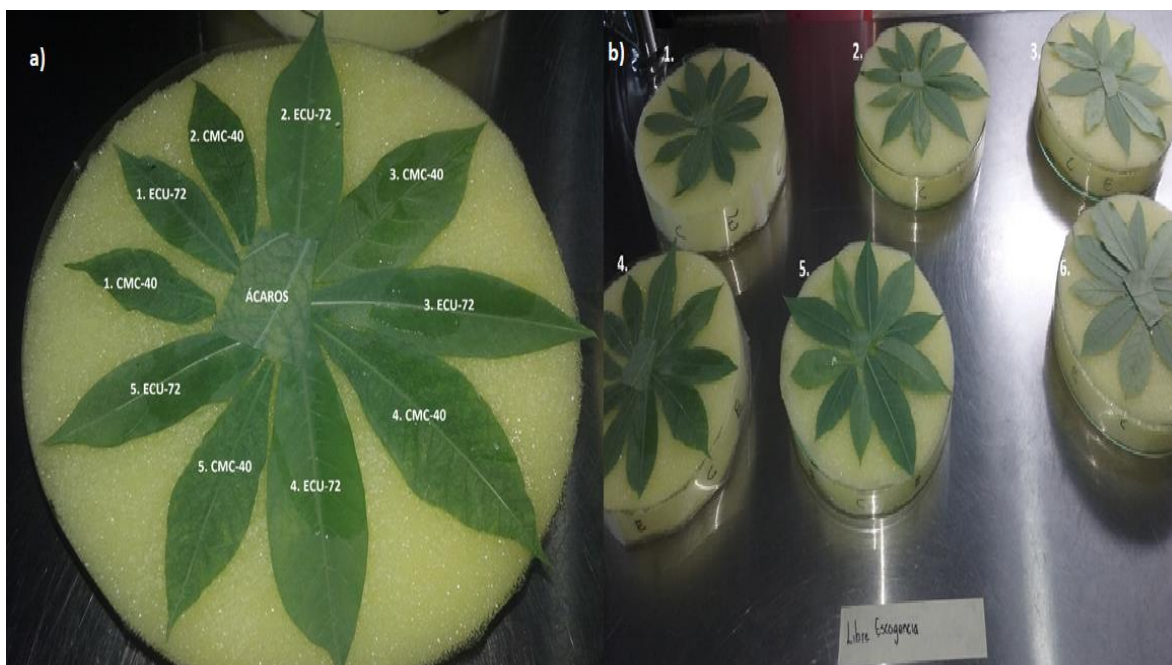


Figura 1. Diseño del experimento a libre escogencia. a), caja de Petri con cinco lóbulos de CMC-40 y cinco lóbulos de ECU-72 intercalados para un total de diez lóbulos. b), seis cajas de Petri con un total de 30 repeticiones de lóbulos por genotipo.

Ensayo a no libre escogencia

En el ensayo a no libre escogencia, el ácaro verde se enfrentó a ambos genotipos de forma independiente, por cada caja de Petri había diez lóbulos del mismo genotipo ECU-70, de la misma manera se realizó con el genotipo CMC-40. Se

utilizaron tres cajas de Petri por genotipo para un total de 30 repeticiones de lóbulos por cada genotipo (Figura 2).



Figura 2. Diseño del experimento a no libre escogencia. Seis cajas de Petri con diez lóbulos, de las cuales tres cajas contienen lóbulos ECU-72 y tres cajas contienen lóbulos CMC-40 para un total de 30 repeticiones de lóbulos por cada genotipo.

Análisis estadístico

Se realizó análisis estadístico de la oviposición por medio de un gráfico de cajas y bigotes para observar la distribución de los datos, si los datos no presentaban una distribución homogénea se realiza la prueba de rangos de Wilcoxon utilizando software estadístico R, el cual nos permite comparar el rango medio de dos muestras relacionadas y determinar si las diferencias entre ellas se deben al azar o no. Para esta prueba se manejaron dos hipótesis:

H_0 : La variable oviposición tiene la misma distribución en los dos genotipos (las medianas son iguales).

H₁: En una población, la oviposición tiende a dar valores mayores que en la otra (las medianas son diferentes).

Búsqueda de genes con el software Genevestigator

Genevestigator es paquete de software el cual tiene herramientas basadas en web que proporcionan información cuantitativa categorizada sobre genes contenidos en grandes bases de datos de microarrays. Este software, en uso desde 2004, se ha venido actualizado para permitir consultas más rápidas, más potentes y más diversas para el análisis de función de genes (Zimmermann *et al.*, 2005).

En la búsqueda de genes de defensa relacionados con la vía del etileno, se escogió a *Arabidopsis thaliana* por ser el organismo modelo por preferencia para las plantas, se refinó la selección por condiciones como perturbaciones bióticas, donde se pudo comparar varios experimentos relacionados con el tema de estudio de interés, en este caso se escogieron los trabajos reportados con artrópodos plaga en *A. thaliana*.

Diseño de primers

El diseño de primers se realizó con la herramienta Primer 3 (<http://primer3.ut.ee>). Previo al desarrollo de los primers, fue necesario hacer un BLAST en el portal de genomas de Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov>), debido a que las secuencias de los genes provienen del genoma de *Arabidopsis thaliana*. Una vez obtenidas las secuencias del genoma de la yuca, producto del alineamiento en BLAST, se procedió al desarrollo de los primers (Tabla 2).

El PCR se realizó en un termociclador MultiGene OptiMax Thermal Cycler, este se llevó a cabo por medio de la preparación de un cóctel de 12.5 µL (Tabla 3), la configuración del termociclador fue la siguiente: un ciclo de desnaturalización a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de alineamiento y de extensión de la cadena a, 94°C por 30 segundos, la temperatura del primer por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos, y una extensión final de 72 °C por 5 minutos. Se tomó como gen de referencia el gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) (F: 5'-

CCGTGTTCCAACCTGTTGATG-3', R: 5'-CTGCACACCCACCAGAGTAA-3', longitud del producto: 190 pb, Tm: 58 °C), el cual es un gen constitutivo no implicado en respuestas de defensa y por tanto su nivel de expresión se mantiene constante durante los tiempos (Contreras & López, 2008).

Tabla 1. Primers diseñados que amplifican un fragmento de los genes 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa, DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP y Protochlorophyllide reductasa A en yuca.

| Gen | Primer | Tm | Forward | Reverse |
|---|--------|-------|--------------------------|--------------------------|
| 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa | ACO4 | 62 °C | AACATCGCTCAAGT CCCTGA | GGCACATCAATCCA CTGGTC |
| DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP | DBRH20 | 59 °C | GTTGCCTGCCATA GTCCATG | ATCTGCCTCATCCAA CACCA |
| Protochlorofilida reductasa A | PORA | 63 °C | AGCAAGTCCAGCA GTCAACA | AGTAGGTTCTTGG CGGTTG |

Tabla 2. Reacciones del cóctel preparado para la amplificación de los genes por PCR.

| Cóctel | 1x |
|--------------------------|----------------|
| Buffer 10x | 1.25 µL |
| dNTP's solution mix 10mM | 0.25 µL |
| Primer F 10µM | 0.625 µL |
| Primer R 10µM | 0.625 µL |
| MgCl ₂ 50mM | 0.5 µL |
| H ₂ O | 7.75 µL |
| ADNc | 1.0 µL |
| Red Taq Polimerasa 1u/µL | 0.5 µL |
| Volumen total | 12.5 µL |

Caracterización estructural de las regiones promotoras

Búsqueda de promotores

Se realizó una búsqueda de las regiones promotoras por medio de la herramienta JBrowser de la plataforma Phytozome, para esto se seleccionaron 1500 pares de bases aguas arriba del codón de inicio de cada gen. El análisis *in silico* se realizó por medio de la plataforma online PlantCARE de bioinformatics & Systems Biology (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), la cual nos permite encontrar motivos *cis* putativos (Lescot *et al.*, 2002).

Análisis de expresión de genes

Se evaluaron tres genes, dos de los cuales se obtuvieron a partir de los resultados obtenidos por Marín-Colorado (2015) (1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa y DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP), el tercer gen se obtuvo por medio de una búsqueda de genes mediante el software Genevestigator (Protochlorophyllide reductasa A). Esta evaluación se realizó usando el ensayo a no libre escogencia, donde se evaluaron dos estados de la interacción, el primer estado consta de un tiempo de cero horas (como control negativo de la interacción), el segundo estado consta de un tiempo de 24 horas y un tiempo final de cuatro días de contacto con el ácaro.

Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó con 100 mg de material vegetal mediante el uso de un kit de extracción comercial, en este caso el kit que se usó fue: InviTrap Spin Plant RNA Mini Kit, para esto se siguieron las indicaciones del fabricante. En total se utilizaron seis muestras de ARN para los análisis (Tabla 3).

Cuantificación y gel de calidad

Las muestras de ADN y ARN extraídas se cuantificaron mediante el uso del espectrofotómetro Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader de BioTek. Los geles de agarosa se realizaron al 1,5 %, se corrieron en una cámara de electroforesis con una configuración de 150 voltios durante 30 minutos, los geles se visualizaron por medio del transiluminador E-Gel Imager de Thermofisher.

Síntesis de ADNc

Se realizó síntesis de ADNc a partir de muestras de ARN con una concentración de 500 ng/μL, para esto se utilizó el kit comercial ProtoScript First Strand cDNA Synthesis. Es necesario mencionar que para obtener mejores resultados se recomienda realizar digestión de ADN mediante el uso de DNAsas, sin embargo, no se realizó la digestión por falta de DNAsa en el laboratorio. Para la síntesis se tomó 7 μL de ARN, se agregó 3 μL de oligo d(T)₂₃ VN [50 μM] y se desnaturalizó a 70 °C durante 5 minutos, las muestras se pusieron sobre hielo y luego se adicionó 10 μL de M-Mulv Reaction Mix [2X] y 2 μL de M-Mulv Enzyme Mix [10X], luego se incubaron a 42 °C durante una hora y se inactivó la enzima a 80 °C durante 5 minutos. Por último, se diluyó la muestra a 50 μL mediante la adición 28 μL de agua libre de nucleasas.

RESULTADOS

Evaluación fenotípica

Ensayo a libre escogencia

La figura 3 muestra que el genotipo CMC-40 (azul) presenta en los primeros dos días valores de oviposición superiores al genotipo ECU-72 (blanco). A partir del tercer día el comportamiento es muy similar. Se observa ausencia de homocedasticidad. No fue posible realizar un contraste para la comparación de los grupos ya que no se pudo aplicar un análisis de comparación de medias, debido a

la falta de homogeneidad de los datos, por ello se decidió aplicar la prueba de rangos de Wilcoxon el cual arrojó un valor de $p = 0.0002236$, de manera que al nivel de significancia de 5 % rechazamos la hipótesis nula, por lo tanto, podemos decir que la ovoposición es diferente en los genotipos evaluados.

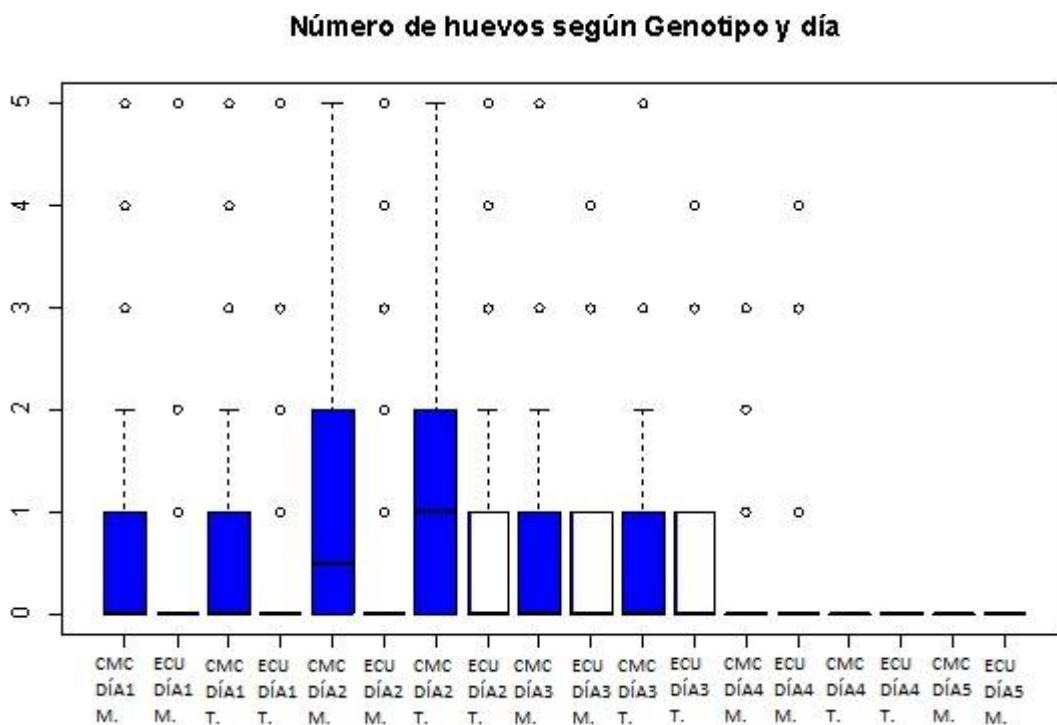


Figura 3. Modelo de cajas y bigotes. Número de huevos según genotipo y día, a libre escogencia.

Se realizó una curva de oviposición (Figura 4), la cual presenta patrones similares en los dos genotipos, los valores muestran una culminación de la oviposición hacia el segundo día en la tarde (día 2T), desde entonces ocurre un descenso notable en el número de huevos. En los tres primeros días el promedio de huevos puesto en el periodo de observación es superior en el genotipo CMC-40, el valor de oviposición más alto fue 1.16.

Para apoyar estos resultados se plantearon varios modelos mixtos (teniendo en cuenta la correlación de los datos) con variable respuesta la oviposición (variable

tipo conteo, por ello se usó el modelo Poisson) y de variables explicativas, el genotipo y el día. Los resultados muestran como el mejor modelo la función polinómica del tiempo en potencia dos con un coeficiente de -0.0984. En cuanto al genotipo, teniendo en cuenta el genotipo CMC-40 como referencia, se puede observar que el genotipo ECU-72 (coeficiente de -0.4470) presenta menor oviposición a través del tiempo, con un rango de diferencia de 0.6 - 1.16.

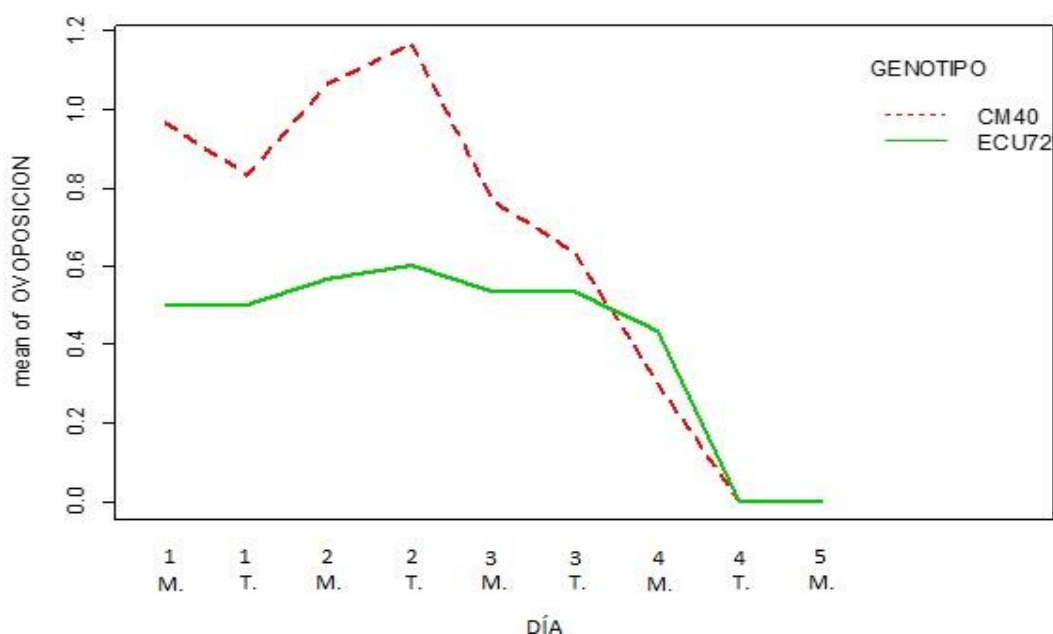


Figura 4. Curva de oviposición de los genotipos CMC-40 y ECU-72, a libre escogencia.

Ensayo a no libre escogencia

En la figura 5 se observa que el genotipo CMC-40 (verde) presenta en el primer día valores superiores al genotipo ECU-72. A partir del segundo día el comportamiento es muy similar. De nuevo se observa ausencia de homocedasticidad, por tal motivo se aplicó la prueba de rangos de Wilcoxon que arrojó un valor $p = 0.04992$. Al nivel de significancia de 5 % la prueba no es concluyente, responde al comportamiento global observado, mostrando diferencias en el primer día, pero luego el comportamiento es muy similar.

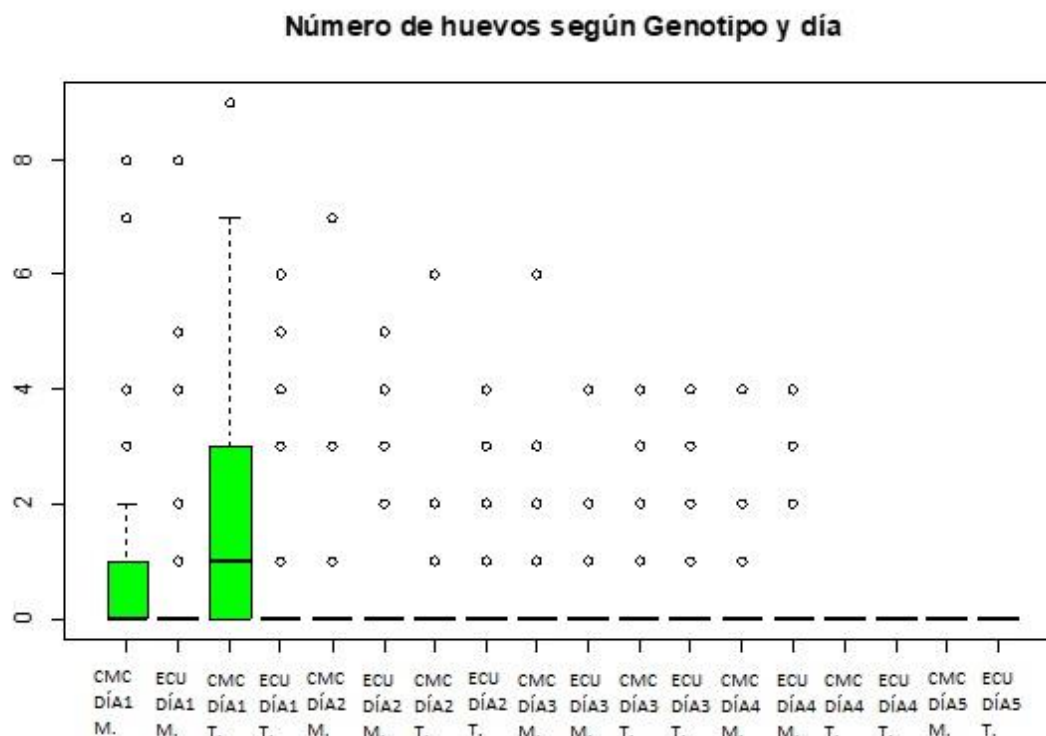


Figura 5. Modelo de cajas y bigotes. Número de huevos según genotipo y día, a no libre escogencia.

Igualmente se realizó una curva de oviposición (Figura 6), en la cual se observa que apoya las observaciones hechas anteriormente. A partir del segundo día se presenta un comportamiento de oviposición muy similar en los dos genotipos, el valor máximo de oviposición fue de 1.56 en el genotipo CMC-40.

Se plantearon varios modelos mixtos para tratar de analizar algunas diferencias, los resultados arrojan como el mejor modelo la función polinómica del tiempo en potencia dos con un coeficiente de -0.05634. En cuanto al genotipo, usando el genotipo CMC-40 como referencia, se puede observar que el genotipo ECU-72 (coeficiente=-0.29726) presenta menor oviposición a través del tiempo, pero esto se debe solo al primer día, donde el rango de diferencia fue de 0.66 - 1.56.

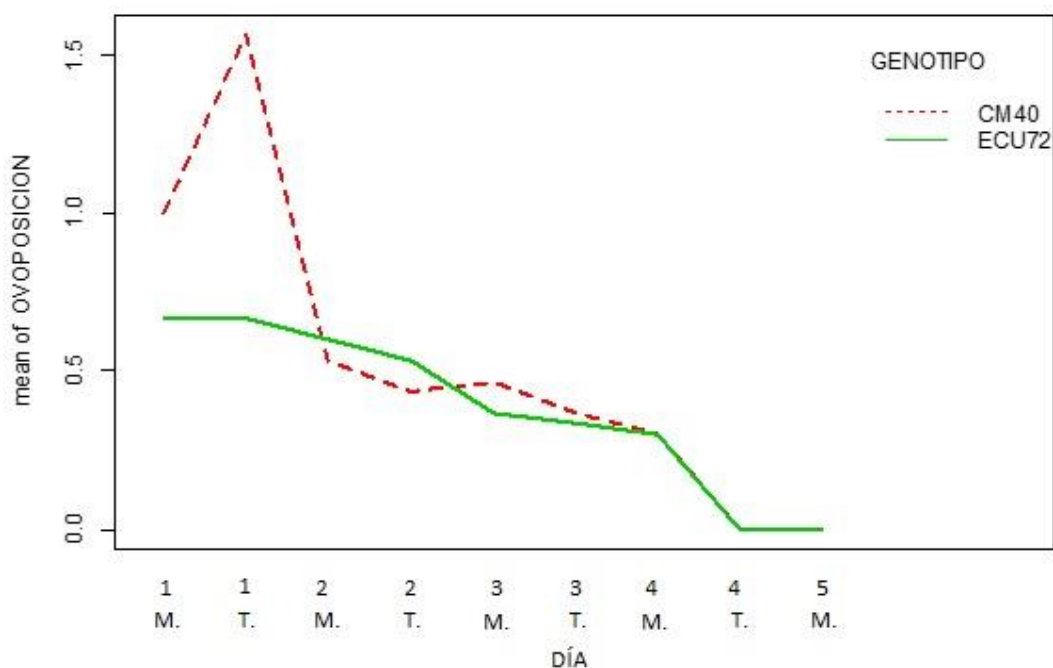


Figura 6. Curva de oviposición de los genotipos CMC-40 y ECU-72, a no libre escogencia.

Genes relacionados con la vía del etileno reportados en la base de datos de Genevestigator

En la búsqueda de genes relacionados con la vía del etileno se evaluaron diferentes experimentos reportados de interacciones planta-artrópodos plaga. El sistema de búsqueda que se utilizó, fue elegir dentro de los experimentos los genes que se reportan como sobre-regulados y reprimidos. En los experimentos evaluados de *Arabidopsis thaliana*, estaban relacionadas los siguientes artrópodos plaga: *Bemisia tabaci* (mosca blanca), *Liriomyza huidobrensis* (mosca minadora) y *Myzus persicae* (pulgón del melocotonero). En total 21 experimentos fueron reportados para estas interacciones y se encontraron dos genes relacionados con la vía del etileno.

Los genes relacionados con el etileno que se encontraron fueron el gen PORA y el gen ERF6, específicamente en experimentos de la interacción de *A. thaliana* con *B. tabaci*. Para el caso de PORA, el gen se reportó con niveles reprimidos en la

expresión génica, con un valor de Log2-ratio = -1.98 (Figura 7). Por otra parte, ERF6 también se reporta con niveles reprimidos en la expresión génica, con un valor de Log2-ratio = -0.67 (Figura 8).

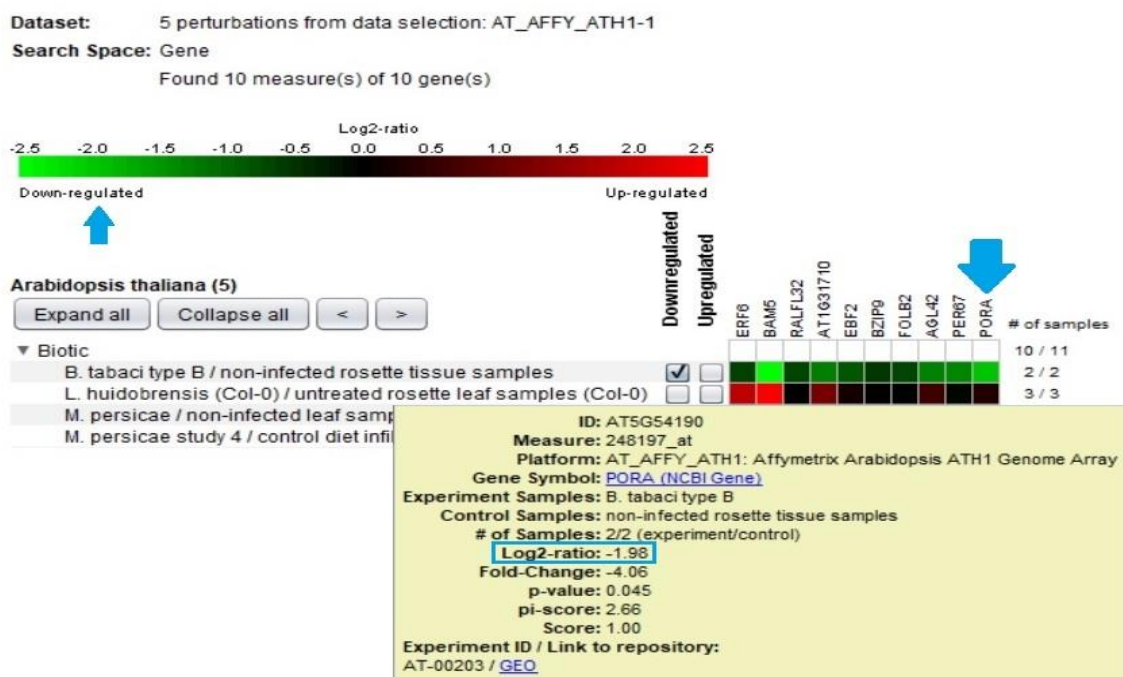


Figura 7. Gen PORA con niveles reprimidos de expresión génica en la interacción de *Arabidopsis thaliana* con *Bemisia tabaci*.

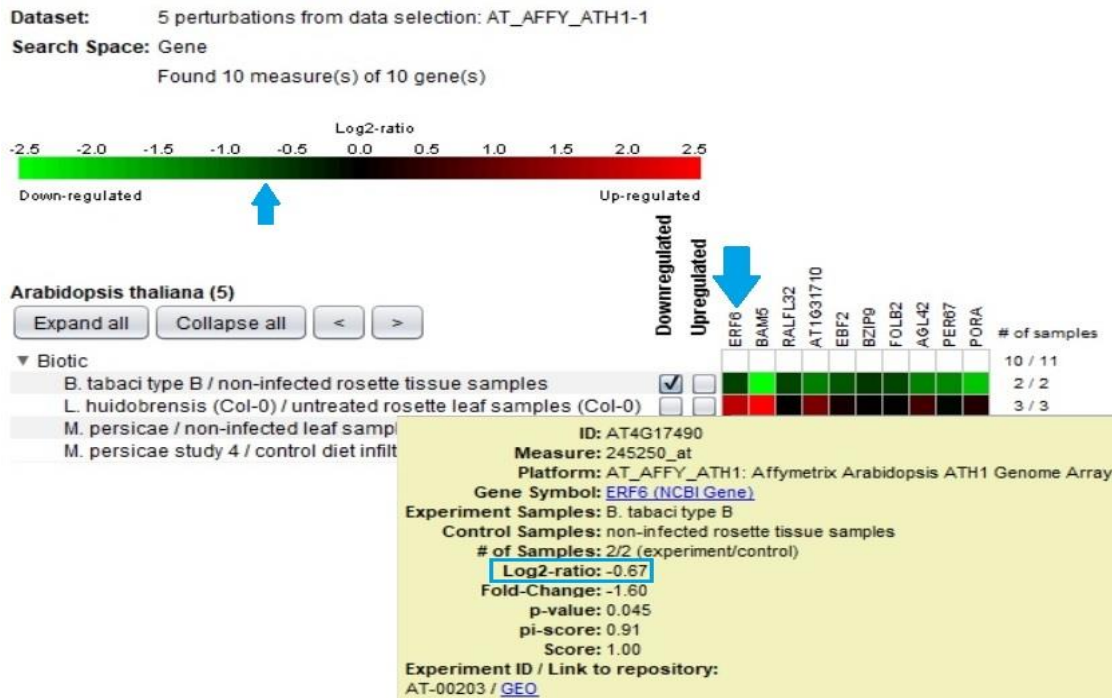


Figura 8. Gen ERF6 con niveles reprimidos de expresión génica en la interacción de *Arabidopsis thaliana* con *Bemisia tabaci*.

Caracterización estructural de las regiones promotoras

A partir de los genes de interés 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa, DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP y Protoclorofilida reductasa A, asociados a la vía de señalización del etileno, los cuales se obtuvieron a partir de *Arabidopsis thaliana*, se realizó alineamiento en BLAST para obtener las secuencias en nuestra planta de interés *Manihot esculenta*. Para el gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa se encontraron tres secuencias en yuca similares a la de *A. thaliana* (Figura 9).



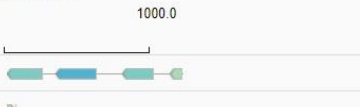



| Define | Score | E | Target View [click feature to view in JBrowse] | |
|----------------|-------|---------|--|---|
| ▶ Chromosome13 | 228.5 | 9.2E-58 |  |  |
| ▶ Chromosome16 | 201.5 | 1.3E-49 |  |  |
| ▶ Chromosome12 | 176.2 | 5.1E-42 |  |  |

Figura 9. Secuencias del gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa encontradas en yuca.

Una vez obtenidas las secuencias homologas de los genes de interés en el genoma de yuca, se realizó un alineamiento de las secuencias con el software MEGA7 para luego realizar un árbol Neighbor-Joining. Esto nos permitió por medio del índice de Bootstrap saber cuál de esas secuencias es la más similar o cercana a la secuencia original de *A. thaliana*. El árbol Neighbor-Joining arrojó que la secuencia que se encuentra en el cromosoma 16 de *M. esculenta* es la más similar a la secuencia de *A. thaliana* (Figura 10). Una vez encontrada la secuencia de yuca que más se asemeja a la secuencia de *A. thaliana*, el paso a seguir fue obtener los motivos *cis* putativos en la plataforma PlantCARE, para esto fue necesario conseguir la secuencia promotora por medio de la herramienta JBrowse en la base de datos de Phytozome.

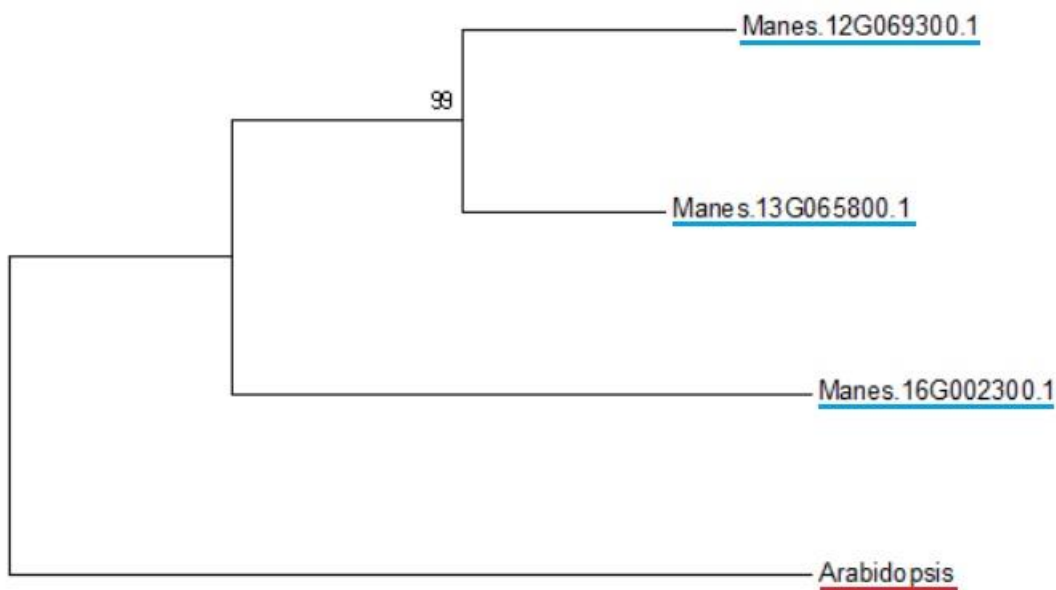


Figura 10. Árbol Neighbor-Joining de las secuencias de *Arabidopsis thaliana* y *Manihot esculenta* del gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa.

Se encontró que el promotor de *A. thaliana* contiene motivos *cis* putativos importantes (Figura 12), el motivo ABRE (TACGTG, TACGGTC) elemento involucrado en la respuesta del ácido abscísico ubicado en la posición -360 y -1249, el motivo ARE (TGGTTT) elemento esencial para la inducción anaeróbica ubicado en las posiciones -514, -1323, -635 y -1400, el motivo AuxRR-core (GGTCCAT) elemento involucrado en la respuesta de auxinas ubicado en la posición +525, el motivo CGTCA y el motivo TGACG elementos involucrados en la respuesta de metil jasmonatos ubicados en las posiciones -85 y +1443, +85 y -1443 respectivamente, el motivo ERE (ATTTCAAA) elemento involucrado en la respuesta del etileno ubicado en la posición +17, el motivo GARE (AAACAGA) elemento sensible a la giberelina ubicado en la posición -1140, el motivo HSE (AAAAAATTTC) elemento involucrado en la respuesta al estrés por calor ubicado en las posiciones +12, -619, -395 y -849, el motivo TC-rich repeats (GTTTTCTTAC) elemento involucrado en la defensa y la respuesta al estrés ubicado en la posición -773, el motivo WUN (TCATTACGAA) elemento sensible a heridas ubicado en la posición -492 y varios motivos (ACE, ATCT, Box 4, Box I, G-Box, GA, GAG, L-box y TCT) involucrados en

la respuesta a la luz (Figura 11).

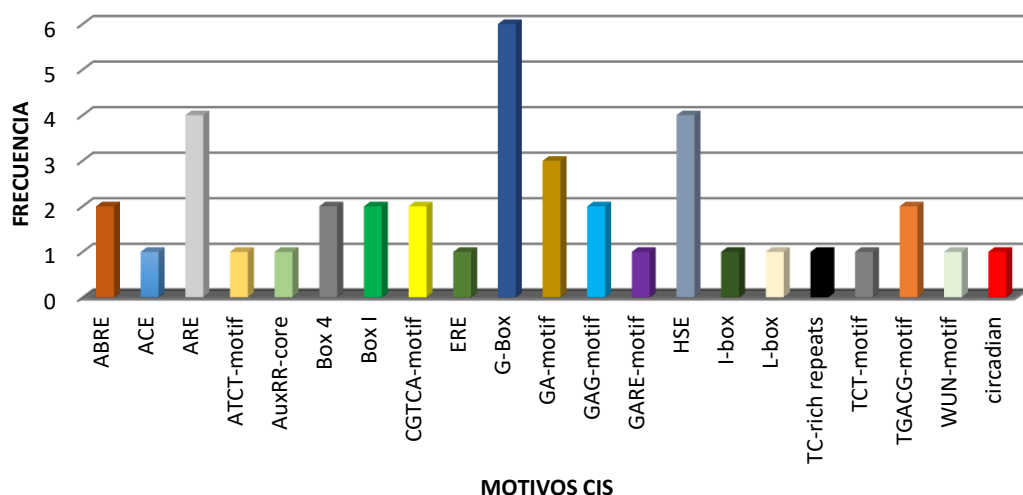


Figura 11. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa en *Arabidopsis thaliana*.

```
>userseq15356 1505nt your sequence is >1500nt.
+ TAGCAAATAT TAAATAATTT AAAATCAATA CATTAGTTGC CAAAACCCGT CTGTGATATT ATACTTTTTG
- ATCGTTTATA ATTCTTTAAA GTTTAGTAAATTAACG GTTTTGGGCA GACACTATAA TATGAAAAAC
+ AGGCTCCATA ATAATGACGT GAGATTTGTT TGTGACTGAG GAAGTGGAAA ATAAAGTTAA GCATGTCTTA
- TCCGAGGTAT TATTACTGCA CTCTAAACAA AACTGACTC CTTCACCTTT TATTTCAATT CGTACAGAAAT
+ CTATTATCAA ATATCAGTTT TTCTATAACA AAGTATGAAT GTTGATCAAA GACAAAAACA AAAAAAAGGT
- GATAATAGTT TATAGTCAAA AAGATATTGT TTCATACCTA CAACTAGTTT CTGTTTTTGT TTTTTTTCCA
+ GATCCACCTT TCTCCAAATA GAAAGGAAGT AAGGCAATGA ATGTTTTTTT TTTTTTTTTT CATTGCATT
- CTAGGTGGAA AGAGGTTTAT CTTTCCTTCA TTCCGTTACT TACAAAAAAA AAAAAAAAAG GTAACGTAAA
+ GCTTTTAAAT CTTATAAGA ATTTGAAAGA AAAATATCTT ATCAACTCTT AGAGGTGATC TTTGGGCCAA
- CGAAATTTA GGAATATTCT TAACTTTCT TTTTATAGAA TAGTTGAGAA TCTCCACTAG AAACCCGGTT
+ AGAGGGAACC ACGTAATCGA ATCTGAACCT CTCCGCTTAA ATGGGAAATT TTATTAGATC TGATAAACGG
- TCTCCCTTGG TGCATTAGCT TAGACTTGAA GAGGCGAATT TACCCTTTAA ATTAATCTAG ACTATTTGCC
+ CCAAAAAGTGA TAGCTCATGA TTCTTAATAT AGACGTGCAT ACAGAGATGT TGTTACCGGC CGAAGAGCAG
- GGTTTTCAC TATCGAGTACT AAGAATTATA TCTGCACGTA TGCTCTTACA ACAATGGCCG GCTTCTCGTC
+ CTTCGTAATC AACGGACACA AATAAACCCAC TATTGGTCCA TCAAAATTA TACAAAACGA ATGAAAACCTG
- GAAGCATTAG TTGCCTGTGT TTAATTGGTG ATAACCAGGT AGTTTAAATT ATGTTTGTCT TACTTTTGAC
+ CTGTGTCATA AGACTAAATA ATTTTGATATA TTATTATGAT TTAGATGGAT GCGGTCTACA AATTTTTTTA
- GACACAGTAT TCTGATTTAT TAAACATAT AATAATACTA AATCTACCTA CGCCAGATTTTAAATAT
+ ACAAAAACCA ACCATTAGTT TGTTTAAGTT ACTTGAAAAC AAGAAAAGGT TCAGTGAAAG GTGATATATA
- TGTTTTGGT TGTGAATCAA ACAAATTCAT TGAACTTTGT TTCTTTTCCA AGTCACCTTC CACTATATAT
+ AGCTATTATT ATTATACACA GAGTAAAAGG AAGAAATGTG AAAAGGAAGA TTAATCCACA CTAAAAGTAA
- TCGATAATA TAAATGTGT TCGAATTTCT TTTTCTTCT AATTAGGTGT TTTTCTTCT AATTATTCATT
+ AAGGAAGAAA ACGGGTCAAA CAATGAATCG TCTGACTGAG TAATAATATA CGTCGCTGTC ATATATTTTG
- TTCTTCTTTT TGCCAGTTT GTTACTTAGC AGACTGACTC ATTATTATAT GCAGCGACAG TATATAAAC
+ TATAACCATA AATTTTTTAT ATTTTTTCCG ACCCAAATTA TTTTGTAGTT TCTATAGCTA GTTACTAAAT
- ATATTGGT TTTTAAATTA TAAAAAAGGC TGGGTTAAT AAAAATCAA AGATATCGAT CAATGATTTA
```

Figura 12. Motivos *cis* putativos encontrados en el promotor de gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa en *Arabidopsis thaliana*.

Dentro del promotor del mismo gen en yuca se encontraron motivos *cis* compartidos con los de *A. thaliana* (ABRE, ARE, AuxRR-core, Box 4, Box I, G-Box, GA, HSE, TC-rich repeats), de los cuales se destaca el motivo TC-rich repeats, ya que es uno de los motivos involucrados en la defensa y en el estrés de la planta, los motivos ABRE Y AuxRR-core fundamentales por estar involucrados en la respuesta de las hormonas del ácido abscísico y de auxinas, sin embargo, en la región promotora de la yuca no se observaron motivos relacionados con el etileno. Al realizar un histograma de frecuencias de los motivos *cis* encontrados, se puede observar que los motivos involucrados con la respuesta de la luz son los más abundantes (Box 4 y G-Box), así como también el motivo HSE (Figura 13).

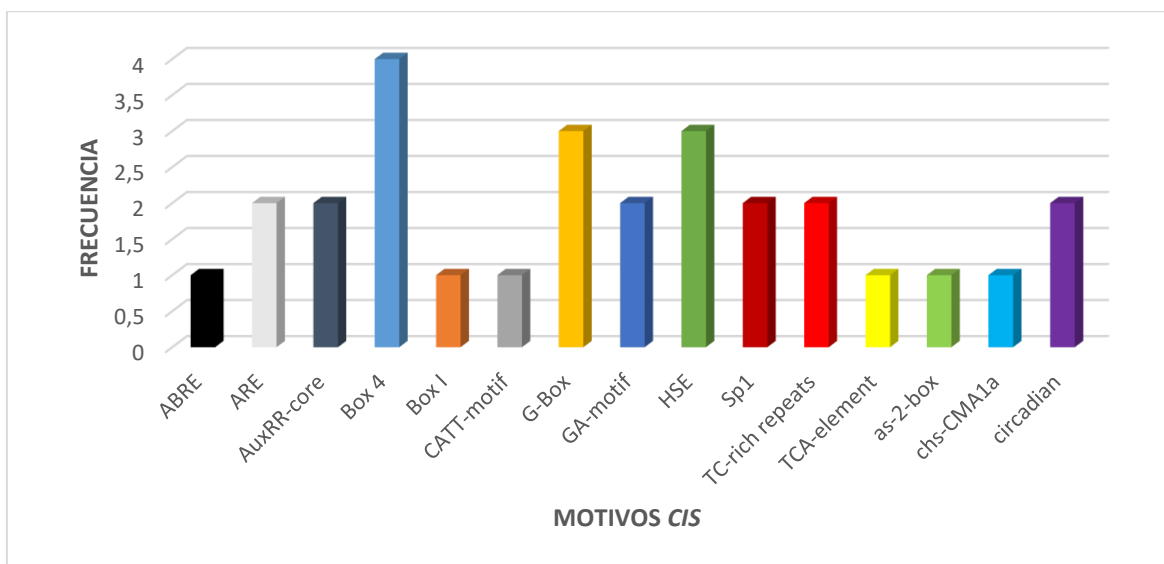


Figura 13. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa en el cromosoma 16 de *Manihot esculenta*.

En cuanto al gen DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP, el árbol Neighbor-Joining (Figura 14) muestra la secuencia del cromosoma 11 de la yuca y la secuencia de *A. thaliana* con un porcentaje Bootstrap del 100%, lo que significa que estas dos secuencias del gen son muy similares.

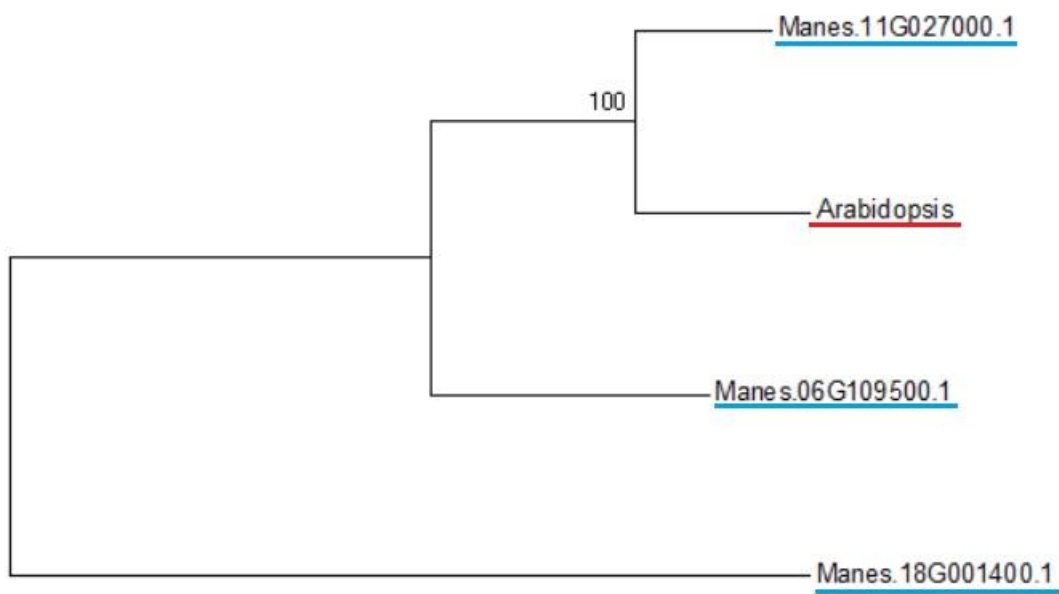


Figura 14. Árbol Neighbor-Joining de las secuencias de *Arabidopsis thaliana* y *Manihot esculenta* del gen DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP.

En la región promotora del gen DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP en *A. thaliana*, se sigue observando el mismo patrón en la frecuencia en que se encuentran motivos involucrados con la respuesta a la luz (G-Box), siendo los estos los más abundantes, el motivo GARE es otro tiene una frecuencia alta (3), siendo uno de los más importantes al ser un elemento sensible a las giberelinas (Figura 15). En esta región promotora se encuentran motivos importantes como los involucrados en la capacidad de respuesta al ácido abscísico (motivo ABRE -1280, +1281), los esenciales para la inducción anaeróbica (motivo ARE -847, -904), los involucrados en la respuesta de metil jasmonatos (motivo CGTCA -1243 y motivo TGACG +1243), los sensibles a las giberelinas (motivo GARE +306, -1301, -331 y motivo P-box -156), los involucrados en defensa y en respuesta al estrés (motivo TC-rich repeats +229) y los involucrados en la capacidad de respuesta al ácido salicílico (motivo TCA -294, +1013).

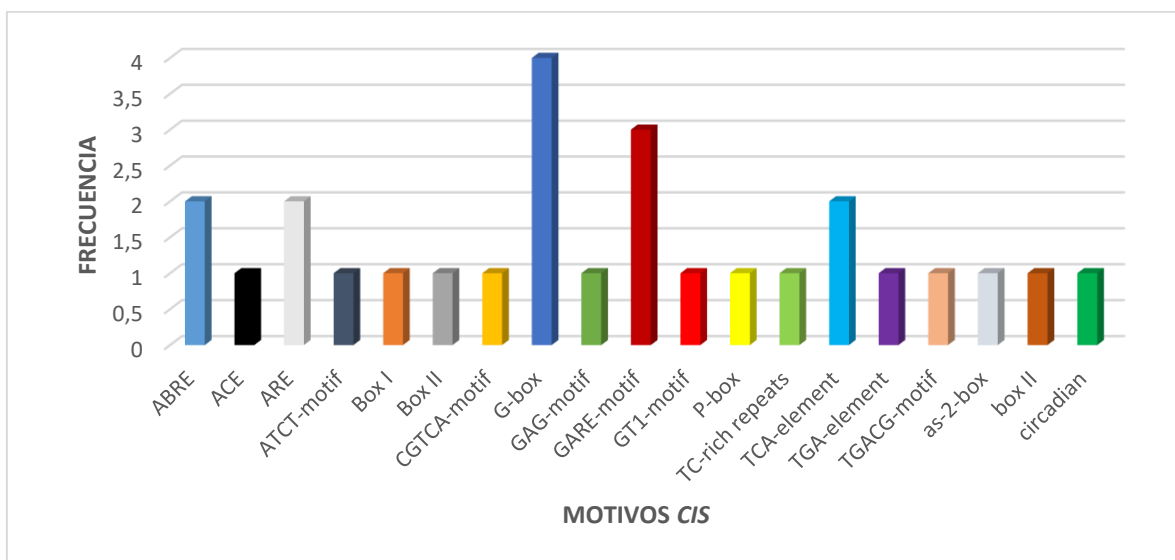


Figura 15. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP en *Arabidopsis thaliana*.

En cuanto a la región promotora del cromosoma 11 de *M. esculenta*, los motivos *cis* más abundantes fueron Box 4 (+527, -1158, +638), Sp1 (+23, -1259, +966) y TC-rich repeats (+178, -749, -213) con una frecuencia de 3 en cada motivo (Figura 16), involucrados en la respuesta a la luz (Box 4 y Sp1) y en la defensa y respuesta al estrés (TC-rich repeats). Otros motivos importantes presentes en esta región promotora fueron el motivo ARE (-1410) elemento esencial para la inducción anaeróbica, el motivo TGA-box (-844) elemento sensible a la auxina y el motivo TGACG (+830, -847) elemento involucrado en la respuesta de metil jasmonatos. Tanto en la región promotora de *A. thaliana* como en la de *Manihot esculenta*, no se observaron motivos relacionados con el etileno.

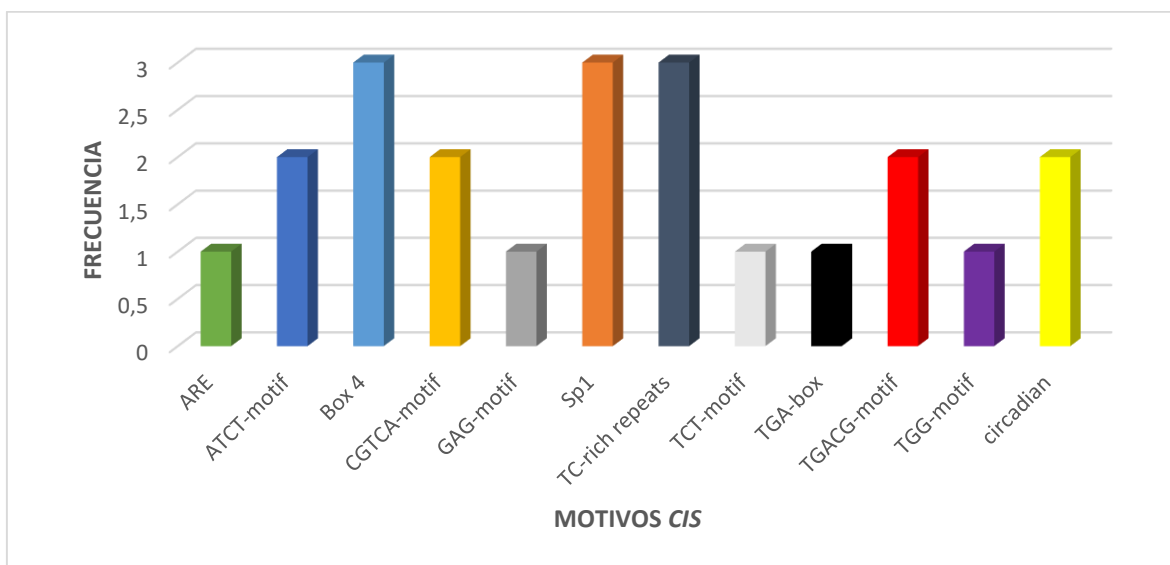


Figura 16. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP en el cromosoma 11 de *Manihot esculenta*.

En el árbol Neighbor-Joining del gen Protoclorofilida reductasa A (Figura 17) se observa que tanto la secuencia del cromosoma 3 y del cromosoma 15 de *M. esculenta* están cercanas a la de *A. thaliana* con un Bootstrap del 89 %, sin embargo, el BLAST realizado en Phytozome señala que la secuencia del cromosoma 3 es la más similar a la secuencia original de *A. thaliana* con un Score de 464.8 (Figura 18).

Con respecto al análisis *in silico* de la región promotora del gen Protoclorofilida reductasa A en *A. thaliana* se encuentra el motivo G-box con la frecuencia más alta (3) involucrado en la respuesta a la luz, ahora bien, dentro de los motivos importantes involucrados en la defensa y en la respuesta al estrés encontramos de nuevo el motivo TC-rich repeats en la posición -517, el motivo ARE elemento esencial para la inducción anaeróbica en la posición -764, el motivo CGTCA y el motivo TGACG involucrados en la respuesta de metil jasmonatos en las posiciones -316, +448 y +316, -448 respectivamente, el motivo HSE involucrado en la respuesta al estrés por calor en la posición +1338, el motivo LTR involucrado en la

respuesta a bajas temperaturas en la posición -130 y el motivo TCA involucrado en la capacidad de respuesta al ácido salicílico en las posiciones +935 y -1243 (Figura 19).

En la región promotora del cromosoma 3 de *M. esculenta*, los motivos más frecuentes son G-box y HSE, involucrados en la respuesta a la luz y en la capacidad de respuesta al estrés por calor respectivamente (Figura 20), otro motivo importante que encontramos es el motivo LTR que está involucrado en la respuesta a baja temperatura y se encuentra en la posición -167. Volvemos a notar que ni en la región promotora de *A. thaliana* ni en la de *M. esculenta* aparecen motivos involucrados con el etileno.

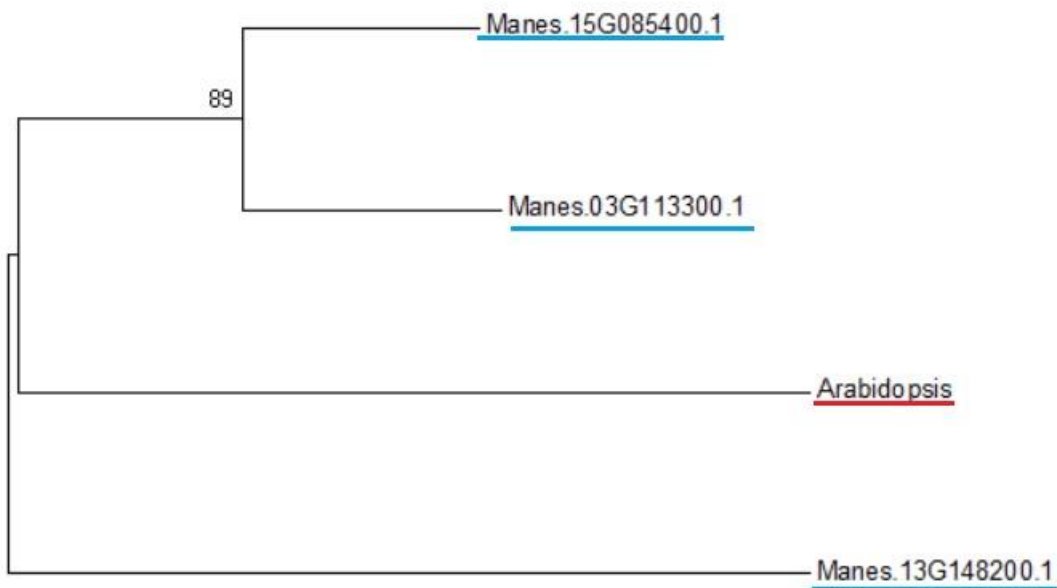


Figura 17. Árbol Neighbor-Joining de las secuencias de *Arabidopsis thaliana* y *Manihot esculenta* del gen Protoclorofilida reductasa A.


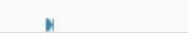

| Define | Score | E | Target View [click feature to view in JBrowse] | |
|----------------|-------|----------|--|--|
| ▶ Chromosome03 | 464.8 | 8.8E-129 | <div>Feature scale</div> <div>1000.0</div>  | <div>Target scale</div> <div>0 29M</div>  |
| ▶ Chromosome15 | 302.4 | 6.4E-80 | <div>Feature scale</div> <div>1000.0</div>  | <div>Target scale</div> <div>0 26M</div>  |
| ▶ Chromosome13 | 293.4 | 3.3E-77 | <div>Feature scale</div> <div>1000.0</div>  | <div>Target scale</div> <div>0 28M</div>  |

Figura 18. Secuencias del gen Protoclorofilida reductasa A encontradas en *Manihot esculenta*.

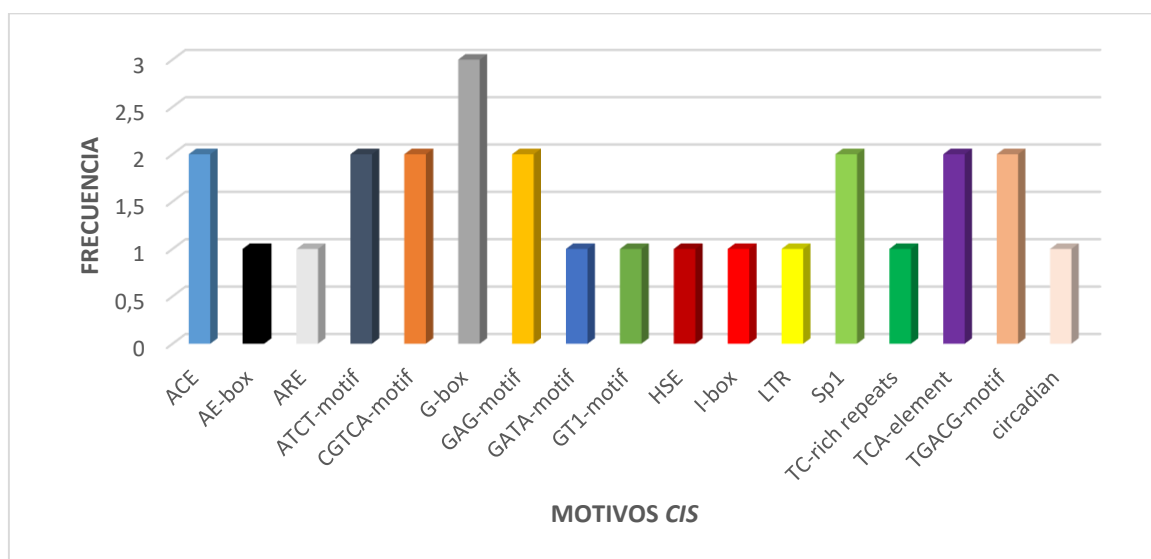


Figura 19. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen Protoclorofilida reductasa A en *Arabidopsis thaliana*.

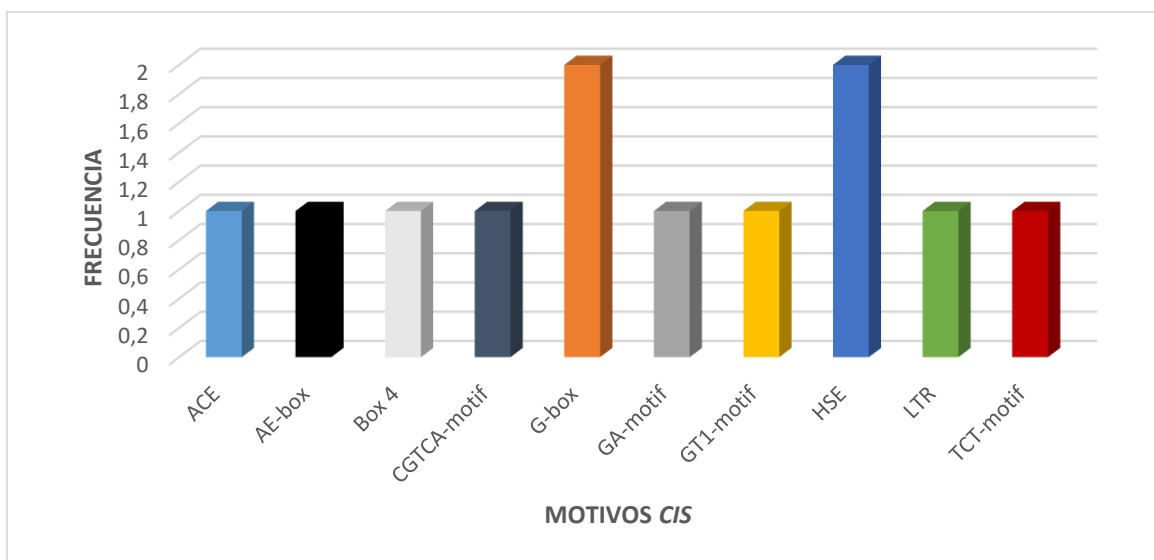


Figura 20. Frecuencia de motivos *cis* encontrados en el promotor del gen Protoclorofilida reductasa A en el cromosoma 3 de *Manihot esculenta*.

Análisis de la expresión génica

Para la evaluación del PCR se utilizaron seis muestras de ARN correspondientes a cada uno de los tiempos estipulados para el análisis molecular con el ácaro verde (Tabla 3). Como control positivo, se amplificó de ADNc con el primer G3PDH (Figura 21), esto con el fin de tener un gen de referencia para el análisis de los demás genes. Como control negativo simplemente se agregó agua en lugar de la muestra de ADNc.

En la figura 22 se observan muestras de ADNc que amplifican un fragmento del gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (ACO4), allí se aprecia que el gen amplificó en todos los tiempos de evaluación (cero horas, 24 horas y cuatro días) y en los dos genotipos de la yuca (CMC-40 y ECU-72), sin embargo, se puede notar que en el genotipo resistente (ECU-72) las bandas lucen más gruesas y quizás un poco más nítidas. Por otra parte, el genotipo CMC-40 luce una banda en el tiempo cero horas, delgada en comparación con las demás bandas, que luego en el tiempo 24 horas y cuatro días, las bandas lucen un grosor ya característico del genotipo

resistente. Esto puede indicar que el gen efectivamente se expresa en ambos genotipos, pero que en el caso de CMC-40, su expresión se demora un poco más en alcanzar los niveles ideales como se refleja en los tiempos de evaluación. En el trabajo de Marín-Colorado (2015) se observa el mismo patrón en la regulación proteómica de 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa en el genotipo 60444 (Figura 23), con valores de 1.001179 en el tiempo seis horas, 1.10097 en el tiempo 24 horas, 1.083976 en el tiempo cuatro días y 1.186844 en el tiempo ocho días.

Tabla 3. Muestras de ARN utilizadas en el análisis molecular de la interacción planta-ácaro verde.

| Tiempo | Genotipo | |
|----------|------------|------------|
| | CMC-40 | ECU-72 |
| 0 horas | CA 0h 2.2 | EA 0h 1.1 |
| 24 horas | CA 24h 2.3 | EA 24h 2.1 |
| 4 días | CA 4d 3.2 | EA 4d 2.3 |

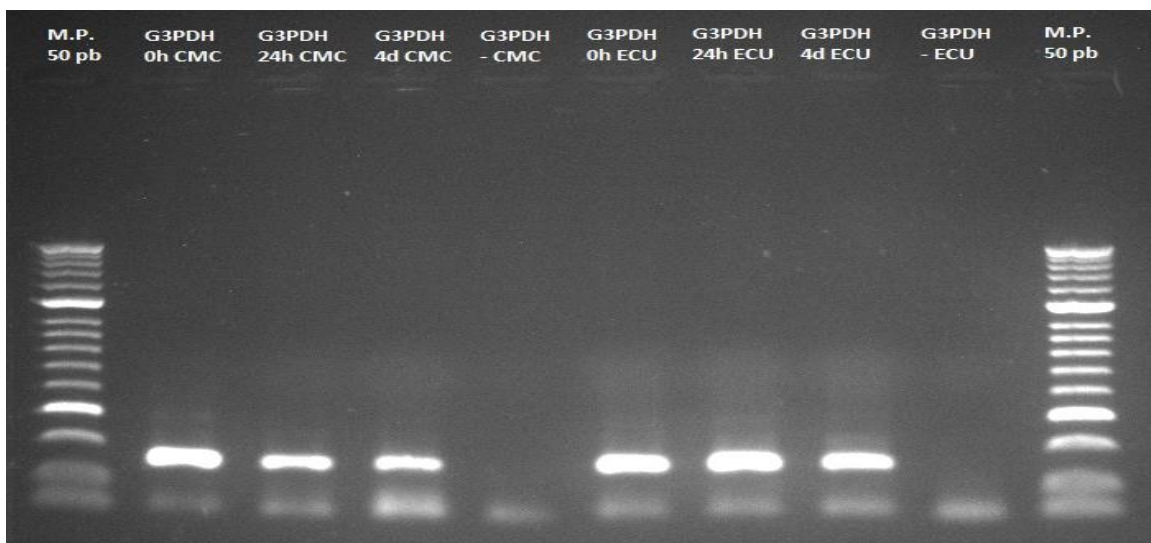


Figura 21. Muestras de ADNc amplificadas con el primer G3PDH, que amplifica un fragmento del gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

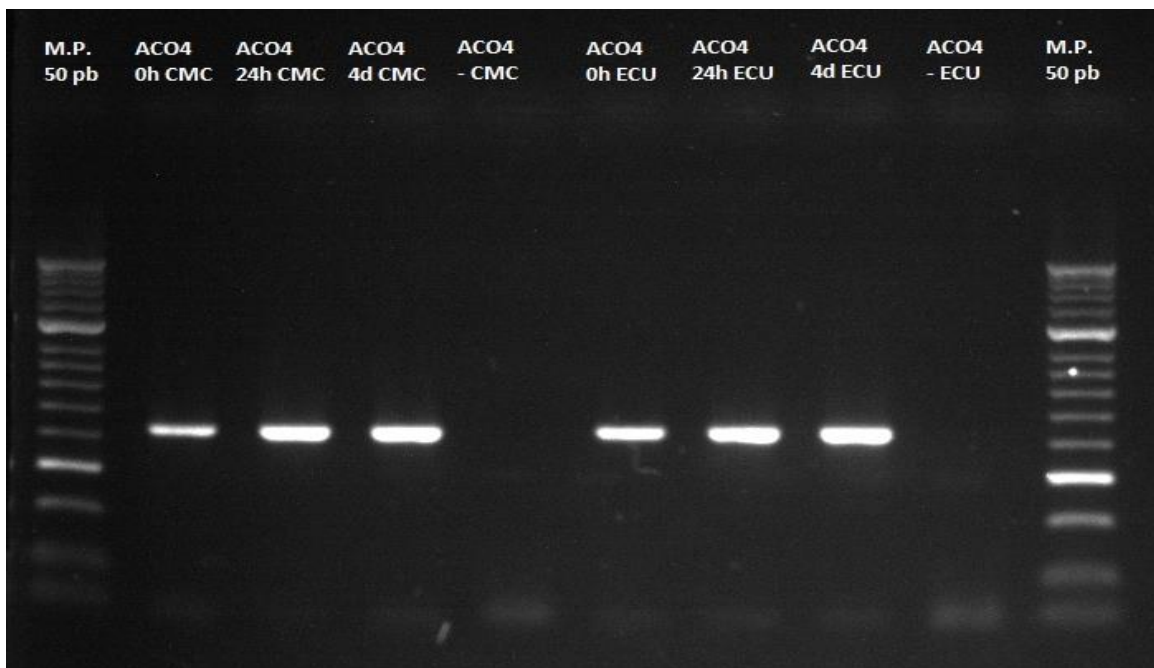


Figura 22. Muestras de ADNc amplificadas con el primer ACO4, que amplifica un fragmento del gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa.

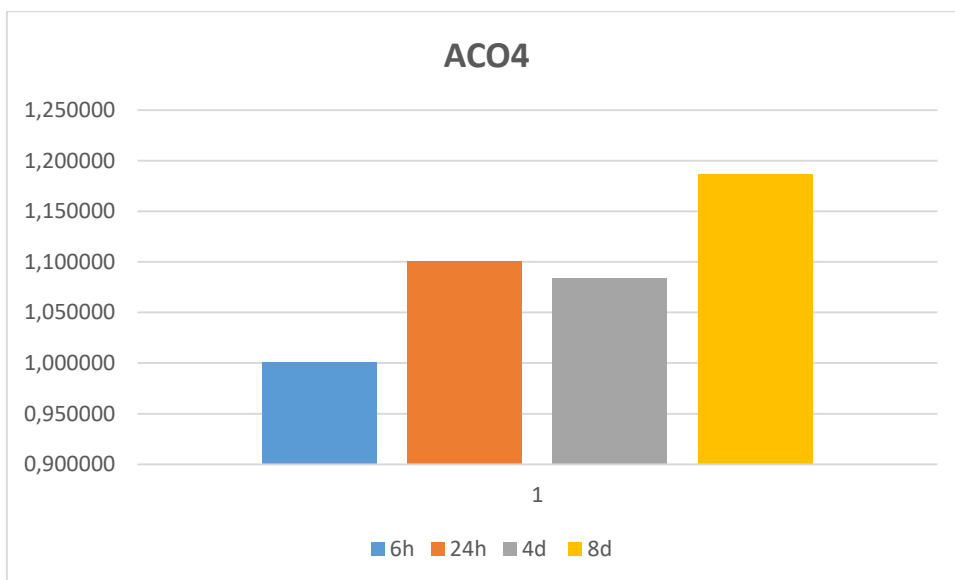


Figura 23. Proteína 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa bajo sobre-regulación identificada por Marín-Colorado (2015) mediante progénesis implicados en metabolismo de hormonas para el genotipo 60444. Los valores en los tiempos evaluados explican la regulación de las proteínas.

En la figura 24 se observan muestras de ADNc que amplifican un fragmento del gen DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP (DBRH20), allí se aprecia que el gen amplificó en todos los tiempos de evaluación y en los dos genotipos de la yuca, sin embargo, se vuelve a apreciar que en el genotipo ECU-72 las bandas lucen más gruesas y nítidas. El genotipo CMC-40 luce una banda en el tiempo cero horas, delgada y tenue, en el tiempo 24 horas luce una banda delgada en comparación con las demás bandas, luego en el tiempo cuatro días la banda luce de un grosor similar a las bandas del genotipo ECU-72. Sin embargo, los resultados de Marín-Colorado (2015) muestran un comportamiento diferente en la regulación proteómica de DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP en el genotipo 60444 (Figura 25), en el tiempo seis horas el valor fue 1.391367, en el tiempo 24 horas el valor fue 1.28162, en el tiempo cuatro días el valor fue 1.260104 y en el tiempo ocho días el valor fue 1.348629.

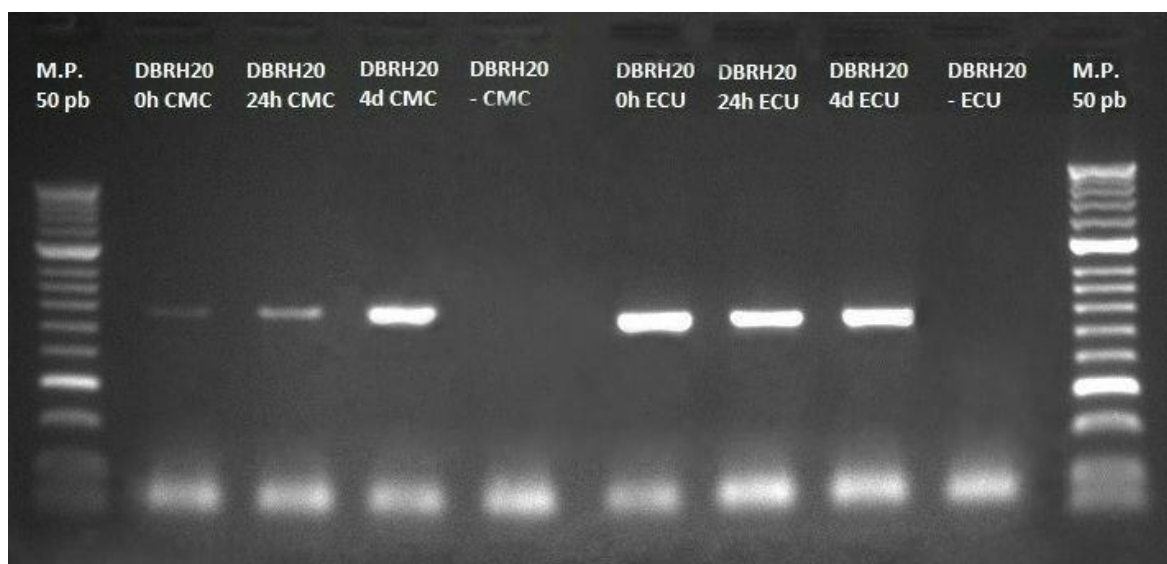


Figura 24. Muestras de ADNc amplificadas con el primer DBRH20, que amplifica un fragmento del gen DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP.

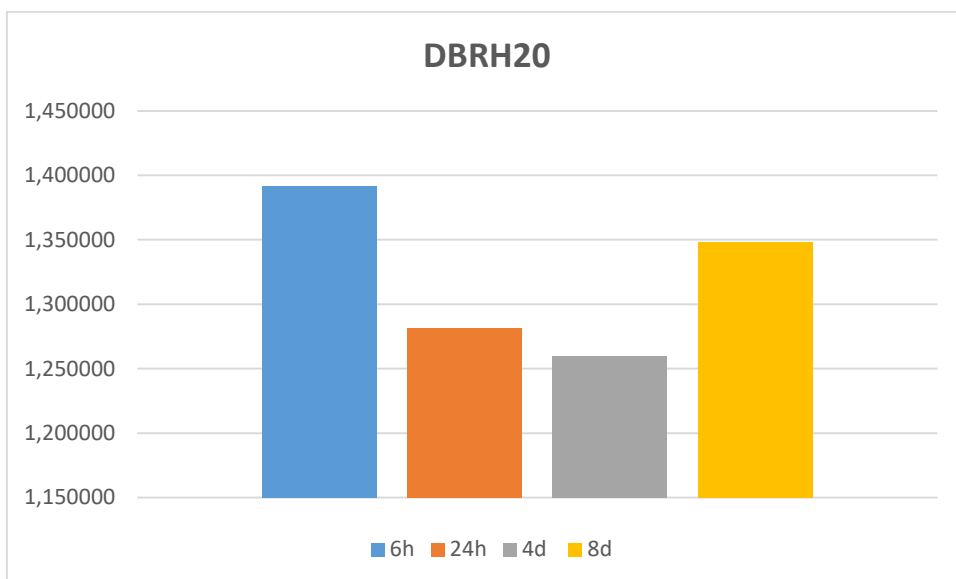


Figura 25. Proteína DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP bajo sobre-regulación identificada por Marín-Colorado (2015) mediante progénesis implicados en metabolismo de hormonas para el genotipo 60444. Los valores en los tiempos evaluados explican la regulación de las proteínas.

En la figura 26 se observan muestras de ADNc que amplifican un fragmento del gen Protoclorofilida reductasa A (PORA), allí se aprecia que el gen amplificó en todos los tiempos de evaluación y en los dos genotipos de la yuca. Se vuelve a apreciar que en el genotipo ECU-72 las bandas lucen más gruesas. Sin embargo, en el genotipo CMC-40 el patrón en los tiempos de evaluación de la expresión génica cambia, luce una banda más gruesa en el tiempo cero, en el tiempo 24 horas luce una banda de tamaño intermedio, luego en el tiempo cuatro días la banda luce de un tamaño mucho más delgado. Esto se puede explicar porque el gen fue seleccionado a partir de unos microarreglos donde reportan al gen como reprimido (Figura 7), lo que se refleja en las bandas conforme avanzan los tiempos de evaluación (Kempema *et al.*, 2007).

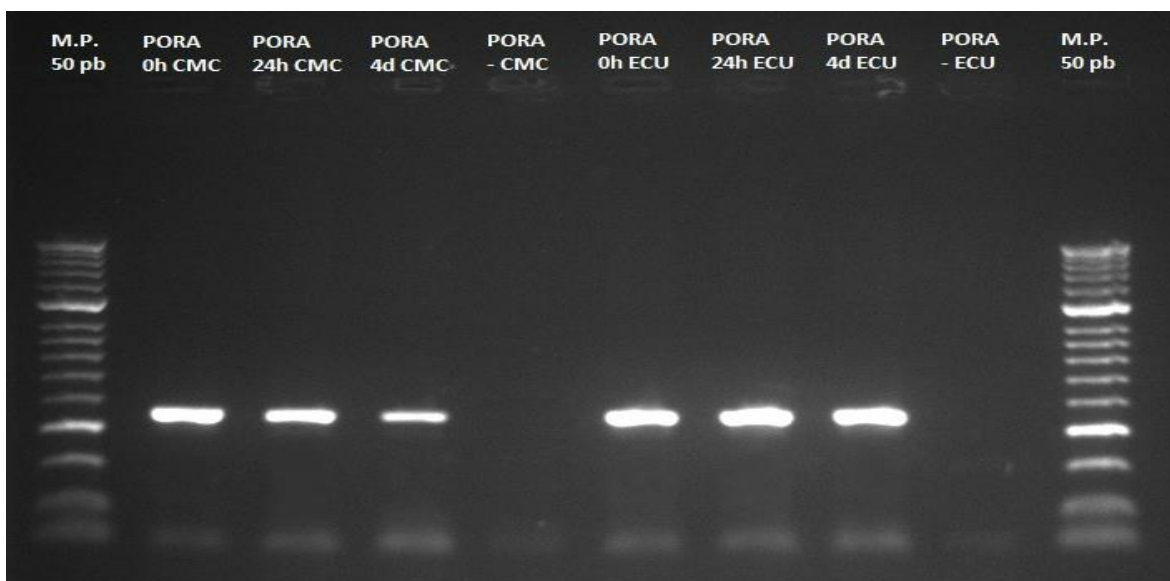


Figura 26. Muestras de ADNc amplificadas con el primer PORA, que amplifica un fragmento del gen Protoclorofilida reductasa A.

DISCUSIÓN

Evaluación fenotípica

Ensayo a libre escogencia

Se observó que el genotipo ECU-72 (coeficiente de -0.4470) presentó menor oviposición a través del tiempo, con un rango de diferencia de 0.6 - 1.16. Marín-Colorado (2015) encontró que a libre escogencia el rango de diferencia de oviposición era de 1.5 - 27.1, donde el genotipo CMC-40 presento mayor oviposición. Otra investigación (Strucker *et al.*, 2017) reporta diferentes genotipos de yuca: G-83, G-92, Amazonas, Recife, Pão, Cigana-preta y IAC-90 são, los cuales presentan menor preferencias de oviposición del ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*) sobre el genotipo AC-100.

Ensayo a no libre escogencia

Se observó que el genotipo ECU-72 (coeficiente=-0.29726) presentó menor

oviposición a través del tiempo, pero esto se debe solo al primer día, donde el rango de diferencia fue de 0.66 - 1.56. En el experimento a no libre escogencia realizado por Marín-Colorado (2015) el rango de diferencia fue de 1.9 - 12.5. Estas preferencias de oviposición están influenciadas por la densidad de los tricomas presentes en las hojas de la yuca (Strucker *et al.*, 2017), de modo que el genotipo ECU-72 el cual tiene una mayor densidad de tricomas, presenta valores inferiores de oviposición.

Genes relacionados con la vía del etileno reportados en la base de datos de Genevestigator

Los genes relacionados con el etileno que se encontraron fueron el gen PORA y el gen ERF6, específicamente en experimentos de la interacción de *A. thaliana* con *B. tabaci*. Para el caso de PORA, el gen se reportó con niveles reprimidos en la expresión génica, con un valor de Log2-ratio = -1.98 (Figura 10). Por otra parte, ERF6 también se reporta con niveles reprimidos en la expresión génica, con un valor de Log2-ratio = -0.67 (Figura 11). Es importante mencionar que estos genes se destacaron como resultados porque además de estar involucrados en la vía de señalización de etileno, presentaban uno de los dos niveles de expresión, sobre-regulación o reprimidos. De modo que el uso de este software no solo es ideal para identificar genes expresados específicamente durante los estreses seleccionados, sino que también sirve para identificar genes en etapas de crecimiento o en órganos específicos (Zimmermann *et al.*, 2004).

Caracterización estructural de las regiones promotoras

Se sabe que el etileno es una fitohormona gaseosa que regula el crecimiento y el desarrollo de las plantas, con este análisis estructural de promotores podemos ver que se presentan motivos *cis* implicados en respuesta de defensa a patógenos y herbívoros, en procesos de respuesta a factores de estrés a heridas, respuesta a bajas temperaturas y respuesta a estrés por calor. En adición, diferentes líneas de evidencia indican que el etileno interacciona con el ácido salicílico, ácido abscísico,

jasmonatos, auxinas y giberelinas (Arimura *et al.*, 2002). Se asume que el etileno estaría relacionado con la acción de auxina dado que, en presencia de ésta, el etileno incrementa sus efectos más allá que el generado por la propia auxina, aunque se admite que por su forma gaseosa, puede llegar a zonas adyacentes más rápidamente donde la auxina no puede acceder (Jordán & Casaretto, 2006).

Etileno es la única hormona vegetal gaseosa, simple y pequeña, presente en angiospermas y gimnospermas, aunque también está presente en musgos, hepáticas, helechos y otros organismos. Al ser un gas puede moverse rápidamente por los tejidos, no tanto por transporte sino por difusión, además su efecto se inicia con cantidades mínimas, lo cual le permite provocar respuestas al estrés de forma casi inmediata (Jordán & Casaretto, 2006). Se ha encontrado que el gen ERF113 el cual pertenece a la familia ERF, posee una respuesta transcripcional para el etileno, el ácido jasmónico, el ácido salicílico y el ácido abisícico, en consecuencia, la sobre-expresión de ERF113 confiere resistencia a los estreses que activan estas hormonas. Por ejemplo, la sobre-expresión de ERF113 desencadena el cierre de estomas y mejora la tolerancia al encharcamiento (Krishnaswamy *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012; Heyman *et al.*, 2018).

Algunos autores proponen que los patrones en los datos de expresión de genes pueden ser explicados con perfiles de los elementos *cis* (Segal *et al.*, 2005; Appel *et al.*, 2014). Con este análisis *in silico* se logró caracterizar motivos *cis* en las regiones promotoras de distintos genes, donde se observó que todos los genes presentan motivos compartidos en las secuencias de *A. thaliana* y de *M. esculenta*. Algunos de estos elementos sirven como importantes componentes reguladores de las vías de señalización de hormonas que responden al ataque de insectos, varios de los elementos *cis* enriquecidos pertenecen a clases bien caracterizadas, que incluyen ABRE, G-Box, I-box, cajas TATA y cajas WRKY (Appel *et al.*, 2014).

Análisis de la expresión génica

Se demostró una regulación positiva de los genes gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa, DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP y Protochlorofilida reductasa A bajo el estrés producido por el ataque del ácaro en los experimentos con los genotipos CMC-40 y ECU-72 de yuca. Los genes 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa y DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP mostraron una sobre-expresión a medida avanzaron los tiempos de evaluación, especialmente a los cuatros días de interacción con el ácaro verde. El gen Protochlorofilida reductasa A presentó baja expresión conforme avanzaron los tiempos de evaluación, evidenciando lo que podría ser un perfil génico reprimido, debido a que este gen ya se ha reportado con baja regulación en *Arabidopsis thaliana* bajo el ataque de *Bemisia tabaci* (Kempema *et al.*, 2007). Sin embargo, para confirmar esto es necesario hacer una evaluación más exhaustiva, con mayores tiempos de evaluación y con análisis cuantitativos como el qPCR en tiempo real (Mestdagh *et al.*, 2009).

El análisis de expresión mediante PCR convencional es fundamental, ya que sirve como el primer paso en la detección de genes con potencial para el establecimiento de futuros genotipos resistentes a herbivoría u otros tipos de estrés (Hossain *et al.*, 2017). Por ejemplo, el gen 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxiadasa (ACCO) ha sido ampliamente estudiado y algunos resultados (Xu *et al.*, 2008; Tsang *et al.*, 2011) indican que forma parte de un mecanismo de señalización que controla el alargamiento de las células de la raíz de forma independiente a la señalización del etileno. Asimismo, otros estudios han demostrado la inducción de la expresión génica de ACCO por estrés biótico y abiótico, tratamientos con fitohormonas (incluida el etileno) y señales de desarrollo y ontológicas en otras especies de plantas (Dorling & McManus, 2012). Además, la expresión de ACCO también puede verse afectada por mecanismos de regulación postranscripcionales y postraduccionales (Datta *et al.*, 2015; Nascimento *et al.*, 2018).

Por otro lado, la creciente evidencia sugiere que DEAD-box ARN helicasa desempeñan un papel importante en los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, probablemente a través de la regulación del metabolismo del ARN y la expresión génica. Algunas investigaciones (Matthes *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2007) demostraron que plantas de *Arabidopsis* transgénicas que expresan el gen OsBIRH1, el cual codifica una proteína de DEAD-box ARN helicasa, poseen una mayor tolerancia al estrés oxidativo y a niveles elevados de expresión de genes de defensa oxidativa. Los resultados sugirieron que el gen OsBIRH1 juega un papel importante en las respuestas de defensa contra estreses bióticos y abióticos. Igualmente, se han identificado más de 50 miembros de DEAD-box ARN helicasa en *Arabidopsis* (Aubourg *et al.*, 1999, Boudet *et al.*, 2001) y a pesar de que se sabe de su participación en varios procesos biológicos, sus funciones precisas y su regulación aún no han sido dilucidadas (Li *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

Se comprobó la preferencia de oviposición del ácaro verde en el genotipo susceptible CMC-40 sobre el genotipo resistente ECU-72 en el experimento a libre escogencia. La prueba no fue concluyente con un nivel de significancia de 5 % en el experimento a no libre escogencia.

Se encontraron dos genes (PORA y EFR6) relacionados con el etileno por medio de uso del software Genevestigator.

Se corroboró la expresión de los genes 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa, DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP y Protoclorofilida reductasa A, por medio de PCR convencional en los dos genotipos de *Manihot esculenta* evaluados, donde se observó que el genotipo ECU-72 presentó mayores niveles de sobre-expresión (bandas más gruesas y claras).

La caracterización estructural de promotores corrobora la relación del etileno con hormonas como el ácido salicílico, el ácido abscísico, jasmonatos, auxinas y giberelinas.

En la caracterización de los genes 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa, DEAD-box ARN helicasa-20 dependiente de ATP y Protoclorofilida reductasa A, se obtuvo resultados esperados en cuanto a motivos *cis* que comparten los tres genes, donde los motivos G-box, ARE y TC-rich repeats son los que más se presentaron en las diferentes regiones promotoras. El gen aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa fue el único que presentó un motivo *cis* involucrado en la respuesta del etileno (motivo ERE). Los motivos involucrados a la respuesta de la luz fueron los más observados (G-box, Box 4, L-Box, ACE, Sp1, GA, GAG y TCT).

REFERENCIAS

- Aguilera M. 2012. La yuca en el Caribe colombiano: De cultivo ancestral a agroindustrial. BANCO DE LA REPÚBLICA-ECONOMÍA REGIONAL.
- Álvarez E, Bellotti AC, Calvert L, Arias B, Cadavid LF, Pineda B, Llano G, Cuervo M. 2002. Guía práctica para el manejo de enfermedades, las plagas y las deficiencias nutricionales de la yuca. Cali: CIAT/CLAYUCA.
- Appel HM, Fescemyer H, Ehlting J, Weston D, Rehrig E, Joshi T, Schultz J. 2014. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* to chewing and sucking insect herbivores. *Frontiers in Plant Science*, 5,565.
- Arias B, Guerrero J. 2000. Control de plagas de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) por resistencia varietal. Memorias XXVII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. SOCOLEN. Medellín - Colombia, Julio 26-28 de 2000. Pp. 243-259.
- Arimura G, Ozawa R, Nishioka T, Boland W, Koch T, Kühnemann F, Takabayashi J. 2002. Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring lima bean plants. *The Plant Journal*, 29(1), 87-98.

- Arimura G, Huber D, Bolhmann J. 2004. Forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*) induce local and systemic diurnal emissions of terpenoid volatiles in hybrid poplar (*Populus trichocarpa* x *deltoides*): cDNA cloning, functional characterization, and patterns of gene expression of (-)-germacrene D synthase, *PtdTPS1*. The Plant Journal, 37, 603-616.
- Aristizábal J, Sánchez T. 2007. Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO 163.
- Aubourg S, Kreis M, Lecharny A. 1999. The DEAD box RNA helicase family in *Arabidopsis thaliana*. Nucleic Acids Research 27, 628–636.
- Balagopalan C. 2002. Cassava utilization in food, feed and industry. In: Hillocks JM, Thresh JM, Bellotti AC (eds) Cassava: Biology, Production and Utilization. CABI Publishing, Oxon, UK, pp 301-318.
- Bellotti AC. 2000. Las plagas principales del cultivo de la yuca: un panorama global. Memorias XXVII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología SOCOLEN Medellin, Colombia, pp 189-217.
- Bellotti AC, 2008. Cassava pest and their management. Encyclopedia of Entomology. In: J.L. Capinera, Kluwer, Dordrecht.
- Bellotti AC, Herrera CL, Hernández M, Arias B, Guerrero JM, Melo EL. 2012. Cassava Pests in Latin America, Africa and Asia. In R. H. Howeler, ed. The Cassava Handbook –A reference manual based on the Asian regional cassava training course, held in Thailand. Cali, Colombia, CIAT. pp. 199-257.
- Bellotti AC, Herrera CJ, Melo EL, Arias B, Guerrero JM, Hernández M. 2006. Control de plagas en el cultivo de la yuca: Ácaros y Mosca Blanca. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, Cali, Colombia.
- Bellotti AC, Riis L. 1994. Cassava cyanogenic potential and resistance to pests and diseases. Acta Horticulturae. 375: 141-145.
- Bellotti AC, Smith L, Lapointe SL. 1999. Recent advances in cassava pest management. Annu. Rev. Entomol. 1999. 44:343–70.
- Bisset JA. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. Revista Cubana de Medicina Tropical, 54(3), 202-219.

- Bohórquez A. 2011. Aislamiento de secuencias expresadas diferencialmente durante la respuesta de defensa al ataque de la mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis*) en el cultivo de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) mediante genómica funcional. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Colombia. Palmira-Colombia.
- Boller T. 1991. Ethylene in pathogenesis and disease resistance. The Plant Hormone Ethylene., 293-314.
- Boudet N, Aubourg S, Toffano-Nioche C, Kreis M, Lecharny A. 2001. Evolution of intron/exon structure of DEAD helicase family genes in *Arabidopsis*, *Caenorhabditis*, and *Drosophila*. Genome Reseach 11, 2101–2114.
- Braam J. 2005. In touch: Plant responses to mechanical stimuli. New Phytologist 165: 373–389.
- Brentassi ME, de Remes Lenicov M. 2015. Oviposición de *Delphacodes kuscheli* (Homoptera-Delphacidae) sobre plantas de cebada en condiciones de laboratorio. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata, 104(1), 67-74.
- Broekaert WF, Delaure SL, De Bolle MF, Cammue BP. 2006. The role of ethylene in host-pathogen interactions. Annual Review of Phytopathology. 44: 393–416.
- Burbano M, Carabalí A, Montoya J, Bellotti AC. 2007. Resistencia de especies de *Manihot* a *Mononychellus tanajoa* (Acariformes), *Aleurotrachelus socialis* y *Phenacoccus herreni* (Hemiptera). Revista Colombiana de Entomología, 33(2), 110-115.
- Byrne DH, Bellotti AC, Guerrero JM. 1983. The cassava mites. International Journal of Pest Management, 29(4), 378-394.
- Carrillo R, Pérez H, Neira M. 2002. Comportamiento de oviposición de *Aegorhinus superciliosus* (Guerin) (Coleoptera: Curculionidae). Agro sur, 30(1), 47-50.
- Ceballos H, Fregene M, Lentini Z, Puentes J, Pérez J, Rosero A, Tofiño A. 2006. Development and identification of high-value cassava clones. Acta Hortícola 703: 63-70.
- Ceballos H, Iglesias CA, Pérez JC, Dixon A. 2004. Cassava breeding: opportunities and challenges. Plant Molecular Biology 56: 503–516.

- CIAT. 2002. La yuca en Colombia y el mundo: nuevas perspectivas para un cultivo milenario. La yuca en el tercer milenio. Publicación CIAT. Cali, Colombia.
- CIAT. 2006. Manejo integrado de moscas blancas asociadas al cultivo de la yuca. Proyecto Manejo Integrado Sostenible de Moscas Blancas Como Plagas y Vectores de Virus en los Trópicos. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia.
- Cohn JR, Martin GB. 2005. *Pseudomonas syringae* pv. tomato type III effectors AvrPto and AvrPtoB promote ethylene-dependent cell death in tomato. *Plant J.* 44:139–54
- Contreras E, López CE. 2008. Expresión de dos genes candidatos a resistencia contra la bacteriosis vascular en yuca. *Acta Biológica Colombiana.*, 2, 175-188.
- Costa EC, Teodoro AV, Rego AS, Maciel AG, Sarmento RA. 2012. Population structure and dynamics of the cassava green mite *Mononychellus tanajoa* (Bondar) and the predator *Euseius ho* (DeLeon) (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae). *Arthropods*, 1(2), 55.
- Datta R, Kumar D, Sultana A, Hazra S, Bhattacharyya D, Chattopadhyay S. 2015. Glutathione regulates 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase transcription via WRKY33 and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by modulating messenger rna stability to induce ethylene synthesis during stress. *Plant Physiol.* 169, 2963–2981.
- Delessert C, Wilson I, Van Der Straeten D, Dennis E, Dolferus R. 2004. Spatial and temporal analysis of the local response to wounding. *Plant molecular biology*, 55(2), 165-181.
- De Moraes CM, Mescher MC, Tumlinson JH. 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature*, Vol 410.
- Devine GJ, Eza D, Ogusuku E, Furlong MJ. 2008. Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista peruana de medicina experimental y Salud Pública*, 25(1), 74-100.

- Dorling SJ, McManus MT. 2012. "The fate of ACC in higher plants," in Annual Plant Reviews, Vol. 44. eds B. A. Ambrose, and M. Purugganan (Oxford: Wiley-Blackwell), 83–115.
- Eke-Okoro ON, Njoku DN, Madu A, Ezulike TO. 2009. Impact of global warming and crop factors on the growth and productivity of four cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars in Nigeria. Scientific Research and Essay Vol.4 (10), pp. 955-960.
- FAO. 2006. Datos agrícolas de FAOSTAT. Producción. Cultivos primarios. En Base de datos estadísticos de la FAO.
- FAO. 2012. Food outlook. Global market analysis – November 2012. Rome.
- FAO. 2014. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. FAOSTAT Statistical Databases.
- Faria M, Wraight S. 2001. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. Crop Protection 20 (9): 767-778.
- Farmer, E.E. 2001. Surface-to-air signals. Nature 411(6839): 854-856.
- Franco D, Domínguez J, de Castro MDP, Aránega A. 2002. Regulación de la expresión génica en el miocardio durante el desarrollo cardíaco. Revista Española de Cardiología, 55(2), 167-184.
- Gleadow RM, Evans JR, McCaffery S, Cavagnaro TR. 2009. Growth and nutritive value of cassava (*Manihot esculenta* Cranz.) are reduced when grown in elevated CO₂. Plant Biology, 11(s1), 76-82.
- Harfouche AL, Shivaji R, Stocker R, Williams PW, Luthe DS. 2006. Ethylene signaling mediates a maize defense response to insect herbivory. Molecular plant-microbe interactions, 19(2), 189-199.
- Haswell ES, Peyronnet R, Barbier-Brygoo H, Meyerowitz EM, Frachisse JM. 2008. Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the *Arabidopsis* root. Current Biology 18: 730–734.
- Hernandez-Garcia CM, Finer JJ. 2014. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. Plant Science, 217, 109-119.

- Herrera B. 2009. Predicción de distribución potencial de plagas de yuca, utilizando modelos de nicho ecológico. Universidad del Valle, Departamento de Geografía. Decisión y análisis de políticas – CIAT.
- Heyman J, Canher B, Bisht A, Christiaens F, De Veylder L. 2018. Emerging role of the plant ERF transcription factors in coordinating wound defense responses and repair. *J Cell Sci*, jcs-208215.
- Hilker M, Meiners T. 2006. Early herbivore alert: insect eggs induce plant defense. *Journal of chemical ecology*, 32(7), 1379-1397.
- Hillocks JM. 2002. Cassava in Africa. In: Hillocks JM, Thresh JM, Bellotti AC (eds) *Cassava: Biology, Production and Utilization*. CABI Publishing, Oxon, UK, pp 209-235.
- Himani S, Sonia S, Sneha N, Rekha M, Indu S, Ravish C. 2014. Computational analysis of cis-acting regulatory elements in 5' regulatory regions of sucrose transporter gene families in wheat and *Arabidopsis*. *Research Journal of Biotechnology* Vol, 9, 4.
- Hossain MM, Imran S, Islam MA, Abdul M. 2017. Expressional analysis of OsNHX1, OsNHX2, OsSOS1 and Os DREB transporters in salt tolerant (FR13A) and salt sensitive rice (brri dhan29) induced by salinity stress. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*. Volume 10, pp 64-70
- Ibraheem O, Botha CE, Bradley G. 2010. In silico analysis of cis-acting regulatory elements in 5' regulatory regions of sucrose transporter gene families in rice (*Oryza sativa* Japonica) and *Arabidopsis thaliana*. *Computational biology and chemistry*, 34(5-6), 268-283.
- Inbar M, Gerling D. 2008. Plant-mediated interactions between whiteflies, herbivores, and natural enemies. *Annual Review of Entomology* 53: 431-448
- Jansson C, Westerbergh A, Zhang J, Hu X, Sun C. 2009. Cassava, a potential biofuel crop in (the) People's Republic of China. *Applied Energy* 86, Supplement 1: S95-S99.
- Jordán M, Casaretto J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico. *Fisiología vegetal*. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

- Kawai Y, Ono E, Mizutani M. 2014. Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *The Plant Journal*, 78(2), 328-343.
- Kempema LA, Cui X, Holzer FM, Walling LL. 2007. *Arabidopsis* transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. *Plant Physiology*, 143(2), 849-865.
- Kobayashi K, Otegui MS, Krishnakumar S, Mindrinos M, Zambryski P. 2007. INCREASED SIZE EXCLUSION LIMIT 2 encodes a putative DEVH box RNA helicase involved in plasmodesmata function during *Arabidopsis* embryogenesis. *The Plant Cell* 19, 1885–1897.
- Krishnaswamy S, Verma S, Rahman MH, Kav NNV. 2011. Functional characterization of four APETALA2-family genes (RAP2.6, RAP2.6L, DREB19 and DREB26) in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 75, 107-127.
- Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rombauts S. 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research*, 30(1), 325-327.
- Li D, Liu H, Zhang H, Wang X, Song F. 2008. OsBIRH1, a DEAD-box RNA helicase with functions in modulating defence responses against pathogen infection and oxidative stress. *Journal of experimental botany*, 59(8), 2133-2146.
- Liu P, Sun F, Gao R, Dong H. 2012. RAP2.6L overexpression delays waterlogging induced premature senescence by increasing stomatal closure more than antioxidant enzyme activity. *Plant Mol. Biol.* 79, 609-622.
- López RA, Carmona D, Trumper E, Huarte M. 2015. Comportamiento de la actividad alimentaria y de oviposición de *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) (Diptera: Agromyzidae), en variedades de *Solanum tuberosum* L. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 19(1), 1-17.
- Louder RK, He Y, López-Blanco JR, Fang J, Chacón P, Nogales E. 2016. Structure of promoter-bound TFIID and model of human pre-initiation complex assembly. *Nature*, 531(7596), 604.

- Mann C. 1997. Reseeding the green revolution (vol 277, pg 1038, 1997). *Science* 277: 1593-1593.
- Marín-Colorado JA. 2015. Caracterización Molecular de la Resistencia en Yuca (*Manihot esculenta* Crantz) al ataque del ácaro verde (*Mononychellus tanajoa*): una aproximación proteómica. Tesis de doctorado. Universidad del Valle - Univalle.
- Márquez JM. 2011. El manejo integrado de plagas. El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala. (Melgar M, Meneses A, Orozco H, Pérez O, Espinosa R. Eds). CENGICANA, Guatemala, 204-231.
- Martínez G, Soler R, Dicke M. 2013a. Behavioral Ecology of Oviposition-Site Selection in Herbivorous True Bugs. In: *Advances in the Study of Behavior*, Elsevier 45: 175-207.
- Martínez G, González A, Soler R, Dicke M. 2013b. ¿Cómo es afectada la selección de sitios de alimentación y oviposición en *Thaumastocoris peregrinus* por la presencia de conespecíficos? Resultados. Editores: Gustavo Balmelli.
- Matthes A, Schmidt S, Kohler D, Forner J, Wildum S, Raabe M, Urlaub H, Binder S. 2007. Two DEAD-box proteins may be part of RNA-dependent high-molecular-mass protein complexes in *Arabidopsis* mitochondria. *Plant physiology*, 145(4), 1637-1646.
- Maruthi MN, Hillocks RJ, Mtunda K, Raya MD, Muhanna M, Kiozia H, Thresh JM. 2005. Transmission of Cassava brown streak virus by *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Journal of Phytopathology*, 153(5), 307-312.
- Mendonça RS, Navia D, Diniz IR, Flechtmann C. 2011. South American spider mites: New hosts and localities. *Journal of Insect Science* 11.
- Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. 2009. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome biology*, 10(6), R64.
- Mutisya DL, Molo R, El-Banhawy EM, Miano D, Kariuki CW, Owiti A, Aool W. 2016. Phylogenetic diversity of cassava green mite, *Mononychellus progresivus* from different geographical sites in east Africa. *African Crop Science Journal*, 24(1), 63-71.

- Nakagawa Y, Katagiri T, Shinozaki K, Qi Z, Tatsumi H, Furuichi T, Kishigami A, Sokabe M, Kojima I, Sato S, Kato T, Tabata S, Iida K, Terashima A, Nakano M, Ikeda M, Yamanaka T, Iida H. 2007. *Arabidopsis* plasma membrane protein crucial for Ca²⁺ influx and touch sensing in roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 104: 3639–3644.
- Nascimento FX, Rossi MJ, Glick BR. 2018. Ethylene and 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) in plant–bacterial interactions. *Frontiers in Plant Science*, 9, 114.
- Nhassico D, Muquingue H, Cliff J, Cumbana A, Bradbury JH. 2008. Rising African cassava production, diseases due to high cyanide intake and control measures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 2043-2049.
- Olsen KM, Schaal BA. 2001. Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: further evidence for a southern Amazonian origin of domestication. *American journal of botany*, 88(1), 131-142.
- Ouaked F, Rozhon W, Lecourieux D, Hirt H. 2003. A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *The EMBO Journal* 22: 1282-1288.
- Overmyer K, Tuomainen H, Kettunen R, Betz C, Langebartels C, Sandermann H, Kangasjarvi J. 2000. Ozone-sensitive *Arabidopsis rcd1* mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate-signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death. *Plant Cell*, 12, 1849–1862.
- Pallangyo B, Hanna R, Toko M, Gnanvossou D, Mgoo V, Otema M, Mfugale O. 2007. Biological control of cassava green mite in Tanzania. In *Proceedings of the 9th ISTRC-AB Symposium* (pp. 597-605), 1-5 November, Mombasa, Kenya.
- Panda N, Khush G. 1995. Host plant resistance to insects. *International Rice Research Institute*, Philippines. pp 431.
- Pastrana FE, Heraldo A, Salcedo JG. 2015. Respuesta de dos cultivares de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) (CM 3306-4 y MCOL 2215) a la aplicación de riego en condiciones hídricas diferentes. *Acta Agronómica*, 64(1), 48-53.
- Penninckx IA, Thomma BP, Buchala A, Métraux JP, Broekaert WF. 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is

- required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 10(12), 2103-2113.
- Pérez I. 2006. Manejo integrado de plagas. Horticultura internacional, (51), 66-67.
- Rangel G, Castro E, Beltran E, Reyes H, García E. 2010. El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 12(2), 90-95.
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez R, Moorman A, 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neurosci. Lett. 339, 62–66.
- Rao MV, Lee HI, Davis KR. 2002. Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. The Plant Journal, 32(4), 447-456.
- Rehrig E, Appel HM, Schultz JC. 2011. Measuring ‘normalcy’ in plant gene expression after herbivore attack. Molecular ecology resources, 11(2), 294-304.
- Rocak S, Linder P. 2004. DEAD-box proteins: the driving force behind RNA metabolism. Nature Reviews Molecular Cell Biology 5, 232–241.
- Rogers D, Appan S. 1973. *Manihot* and *Manihotoides* (Euphorbiaceae): A computer Assisted Study (Hafner, New York).
- Savatin DV, Gramegna G, Modesti V, Cervon F. 2014. Wounding in the plant tissue: the defense of a dangerous passage. Frontiers in plant science, 5, 470.
- Schmelz EA, Carroll MJ, LeClere S, Phipps SM, Meredith J, Chourey PS, Alborn HT, Teal P. 2006. Fragments of ATP synthase mediate plant perception of insect attack. PNAS, 8894–8899, vol. 103, no. 23.
- Segal E, Friedman N, Kaminski N, Regev A, Koller D. 2005. From signatures to models: understanding cancer using microarrays. Nat. Genet. 37(Suppl.) S38–S45.
- Strucker A, da Silva Bandeira HF, Silva AC, Arcanjo JM, Trassato LB. 2017. Preferência alimentar e de oviposição do ácaro-verde (Acari: Tetranychidae) em diferentes genótipos de mandioca em Roraima. REVISTA AGRO@MBIENTE ON-LINE, 11(3), 248-257.

- Suárez L, Mederos V. 2011. Apuntes sobre el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tendencias actuales. Cultivos Tropicales, 32(3), 27-35.
- Tang B, Chen X, Liu Y, Tian H, Liu J, Hu J, Zhang W. 2008. Characterization and expression patterns of a membrane-bound trehalase from *Spodoptera exigua*. BMC Molecular Biology, 9(1), 51.
- Tsang DL, Edmond C, Harrington JL, Nühse TS. 2011. Cell wall integrity controls root elongation via a general 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-dependent, ethylene-independent pathway. Plant Physiol. 156, 596–604.
- Vásquez-Ordóñez AA, Parsa S. 2014. A geographic distribution database of *Mononychellus* mites (Acari, Tetranychidae) on cassava (*Manihot esculenta*). ZooKeys 407: 1–8.
- Vashisht AA, Tuteja N. 2006. Stress responsive DEAD-box helicases: a new pathway to engineer plant stress tolerance. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 84(2), 150-160.
- Wang X, Chang L, Tong Z, Wang D, Yin Q, Wang D, Jin X, Yang Q, Wang L, Sun Y, Huang Q, Guo A, Huang Q. 2016. Proteomics profiling reveals carbohydrate metabolic enzymes and 14-3-3 proteins play important roles for starch accumulation during cassava root tuberization. Scientific reports, 6.
- Wellburn FAM & Wellburn AR. 1996. Variable patterns of antioxidant protection but similar ethene emission differences in several ozone-sensitive and ozone-tolerant plant selections. Plant Cell Environ. 19, 754–760.
- Wu CT, Bradford KJ. 2003. Class I chitinase and β -1,3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves. Plant Physiol. 133:263-273.
- Xu SL, Rahman A, Baskin TI, Kieber JJ. 2008. Two leucine-rich repeat receptor kinases mediate signaling, linking cell wall biosynthesis and ACC synthase in *Arabidopsis*. Plant Cell 20, 3065–3079.
- Yaninek JS. 1988. Continental dispersal of the cassava green mite, an exotic pest in Africa, and implications for biological control. Experimental & applied acarology, 4(3), 211-224.

- Yonow T, Kriticos DJ. 2014. *Mononychellus tanajoa*. HarvestChoice Pest Geography. St. Paul, MN: InSTePP-HarvestChoice.
- Zimmermann P, Hennig L, Gruissem W. 2005. Gene-expression analysis and network discovery using Genevestigator. Trends in plant science, 10(9), 407-409.
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W. 2004. GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. Plant physiology, 136(1), 2621-2632.
- Zou C, Sun K, Mackaluso JD, Seddon AE, Jin R, Thomashow MF, Shiu SH. 2011. Cis-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(36), 14992-14997.